

# Erschließung einer natürlichen Peptid-Protein-Wechselwirkung als molekulare Grundstruktur zur hochaffinen Kopplung von Proteinen und Entwicklung biotechnologischer Anwendungsmodule



TECHNISCHE  
UNIVERSITÄT  
DARMSTADT

Vom Fachbereich Chemie  
der Technischen Universität Darmstadt  
zur Erlangung des akademischen Grades eines  
Doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

genehmigte

Dissertation

vorgelegt von

Dipl. -Ing. (FH) Matthias Schirmer  
aus Leipzig

Referent:	Prof. Dr. Harald Kolmar
Korreferent:	Prof. Dr. Karlheinz Friedrich
Tag der Einreichung:	20. September 2016
Tag der mündlichen Prüfung:	12. Dezember 2016

Darmstadt 2017

D 17

---

## Zusammenfassung

---

Die Steuerung fast aller Vorgänge in biologischen Organismen beruht auf Molekülerkennung. Der weit überwiegende Teil diagnostischer und pharmazeutischer Lösungen basiert auf spezifischen molekularen Wechselwirkungen. Protein-Protein-Interaktionen spielen dabei eine wesentliche Rolle. Um daraus einen Nutzen zu ziehen kommt es darauf an, sich der ausprägenden Struktur motive der Wechselwirkung innerhalb einer Aminosäuresequenzen in geeigneter Weise zu bedienen. Die in den letzten Jahrzehnten etablierten molekularbiologischen Methoden ermöglichen es, derartige Erkennungsmuster für verschiedene biotechnologische Konzepte nutzbar zu machen. So können Proteine, die Gegenstand aktueller biologischer oder biomedizinischer Forschung sind, mit Sequenzbereichen eines interagierenden Proteins fusioniert werden. Mit Hilfe ihres komplementären Interaktionspartners ist es möglich sie zu identifizieren und aus komplexen Stoffgemischen zu isolieren oder ihre Stoffwechselwege zu verfolgen und somit biologische Prozesse zu charakterisieren. Im Idealfall verleihen diese Anhängsel oder Tags dem Fusionsprotein zusätzlich bestimmte Eigenschaften und sind flexibel in verschiedenen Methoden einsetzbar. Die vorliegende Arbeit bedient sich zweier Komponenten des bakteriellen Typ IV Sekretionssystems, ein Konjugationsapparat dessen Proteinkomplex die bakterielle Membran durchspannt und biologische Makromoleküle transportiert. Das TraO-Protein dieses Komplexes weist eine ausgesprochen starke Interaktion gegenüber dem TraN-Peptid auf, wodurch TraO in der äußeren Membran der Zelle verankert wird. Die Interaktionspartner wurden für unterschiedliche Applikationen optimiert und die Wechselwirkungen verschiedener Derivate charakterisiert. Seitens TraO wurden Sequenzmodifikationen zur Verbesserung der biochemischen Eigenschaften vorgenommen. Bei TraN erfolgten eine sukzessive Verkürzung sowie punktuelle Austausche innerhalb der Aminosäuresequenz, um das für die Bindung benötigte Minimalmotiv zu identifizieren und die Sequenz für verschiedene Anwendungen nutzbar zu machen. Letztendlich konnten mehrere Varianten des TraO/TraN-Systems identifiziert werden, die sich zur weiteren Entwicklung biotechnologischer oder biochemischer Applikationen anbieten. Das entwickelte System konnte erfolgreich in der Affinitätschromatographischen Reinigung von biologisch aktiven Zytokinen eingesetzt werden und ist im Western Blot detektierbar. Mit TraN markierte Proteine konnten auf eukaryontischen Zellen exprimiert und nachgewiesen werden. Die zielgerichtete Fluoreszenzmarkierung von Rezeptorproteinen mit Hilfe des TraO/TraN-Systems machte es darüber hinaus möglich, geeignete Sonden herzustellen um Zytokin-Rezeptorinteraktionen auf Oberflächen nachzuweisen. Durch weitere Modifikationen der Bindungspartner konnte eine kovalente Bindung zwischen Protein und Peptid hergestellt werden. Für die unterschiedlichen Applikationen konnten diverse Varianten des Tag-System etabliert werden. Die beschriebenen Ergebnisse zeigen das große Potenzial des TraO/TraN-Systems für die biotechnologische Verwendung auf.

---

---

## Abstract

---

The control of almost every event in biological organisms is dependent on molecular recognition. The vast majority of diagnostic and pharmaceutical applications are based on the deployment of molecular interactions. Thereby protein-protein-interactions play a crucial role. Hence, it comes down to make a use of the amino acid sequence motifs that mark the associates of biological reactions. The molecular biologic methods established over the past decades are used to utilize such recognition sites for biotechnological concepts. Proteins which are subject to current biological or biotechnological research can be fused to sequences of interacting proteins. With its complementary the identification and isolation from a complex composition of substances can be achieved or its metabolic pathways can be tracked and biological processes characterized. Ideally these labels or tags are customizable for diverse applications and provide additional properties to the target protein and can be used flexibly in diverse methods. The present work employs two components of the bacterial type IV secretion system, a conjugation device made of a protein complex, which is spanning the bacterial envelope and is responsible for the transportation of biological molecules. The TraO-protein of this complex shows a very strong interaction towards the TraN-peptide, anchoring TraO in the outer membrane of the cell. The two interacting partners were optimized for different applications and the interaction of the derivatives was characterized. The TraO-sequence was modified to improve its biochemical properties. TraN was gradually shortened and selectively modified to identify the minimum motif for binding and to utilize the sequence for various applications. Eventually several variants of the TraO/TraN-system were identified for further deployment in biotechnological and biochemical applications. The developed system was successfully used for the purification of biologically active cytokines by affinity chromatography and is also detectable in western blot. TraN-labeled proteins were expressed and verified on eukaryotic cells. Moreover, the production of suitable probes by purposeful fluorescent labeling of receptor proteins with the TraO/TraN-system proofed cytokine-receptor-interactions on surfaces. By further modifications of the interacting partners a covalent binding between the TraO and TraN was established. The results of this work show the great potential of the TraO/TraN-system for biotechnological applications.

---

1	Einleitung	11
1.1	Hochspezifische Proteinbindungen und ihre Anwendungen . . . . .	12
1.1.1	Das Prinzip der Proteinbindung / Wechselwirkungen . . . . .	12
1.1.2	Affinitätstags zur Nutzung in der Chromatographie und Detektion . . . . .	13
1.1.3	Anforderungen an Affinitätstags . . . . .	13
1.1.4	Vergleich verschiedener Affinitätstags - Vor- und Nachteile . . . . .	14
1.2	Die Proteine des Typ IV Sekretionssystems . . . . .	16
1.2.1	TraO und TraN als Bestandteil des bakteriellen T4SS aus dem Plasmid pKM101 .	18
1.3	Zielstellung . . . . .	21
2	Material und Methoden	22
2.1	Material . . . . .	22
2.1.1	Bakterienstämme und Medien . . . . .	22
2.1.2	Eukaryotische Zellen und Medien . . . . .	22
2.1.3	Plasmide . . . . .	22
2.1.4	Primer . . . . .	22
2.1.5	Restriktionsendonukleasen . . . . .	22
2.1.6	Antikörper . . . . .	23
2.1.7	Zytokine . . . . .	23
2.1.8	TraN-Peptid . . . . .	23
2.1.9	Chemikalien / Feinchemikalien / Kits . . . . .	23
2.1.10	Geräte und Materialien . . . . .	26
2.1.11	Puffer und Lösungen . . . . .	27
2.2	Mikrobiologische Methoden . . . . .	34
2.2.1	Kultivierung von Bakterien . . . . .	34
2.2.2	Bestimmung der Zelldichte von Bakterienkulturen . . . . .	34
2.2.3	Herstellung chemisch kompetenter <i>E.coli</i> -Zellen . . . . .	34
2.2.4	Transformation von kompetenten <i>E.coli</i> -Zellen . . . . .	34
2.2.5	Herstellung rekombinanter Proteine in <i>E.coli</i> -Zellen . . . . .	34
2.2.6	Rückfaltung rekombinanter Proteine aus Inclusion Bodies . . . . .	35
2.3	Molekularbiologische Methoden . . . . .	35
2.3.1	Isolierung von Plasmid-DNA durch alkalische Lyse und 2-Propanol-Fällung . . . .	35
2.3.2	Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren . . . . .	36
2.3.3	Isolierung von RNA aus primären Zellen und Zelllinien . . . . .	36
2.3.4	Synthese von cDNA . . . . .	37
2.3.5	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) . . . . .	37
2.3.6	Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen . . . . .	39
2.3.7	Ligation von DNA-Fragmenten mit der T4 DNA-Ligase . . . . .	40
2.3.8	Agarosegelelektrophorese . . . . .	40



2.3.9	Gelextraktion linearer DNA-Fragmente . . . . .	40
2.3.10	DNA-Sequenzierung . . . . .	40
2.4	Zellbiologische Methoden . . . . .	40
2.4.1	Kultivierung und Konservierung eukaryontischer Zellen . . . . .	40
2.4.2	Inkulturnahme und Kryokonservierung von Zellen . . . . .	41
2.4.3	Bestimmung der Vitalität und der Zellzahl mit Trypanblau . . . . .	41
2.4.4	Kultivierung und Transfektion von Ba/F3-Zellen . . . . .	41
2.4.5	Einfacher Luciferasereporterassay mit Ba/F3-Zellen . . . . .	42
2.4.6	Transfektion und Kultivierung von HEK293T-Zellen . . . . .	42
2.4.7	Nachweis der P5D4-Oberflächenexpression auf HEK-Zellen . . . . .	42
2.4.8	Stabile Transfektion von Rezeptorketten in HEK293T-Zellen . . . . .	43
2.4.9	Fluoreszenzmikroskopie . . . . .	43
2.4.10	Durchflusszytometrie . . . . .	43
2.5	Proteinbiochemische Methoden . . . . .	44
2.5.1	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese . . . . .	44
2.5.2	Coomassie-Färbung von Polyacrylamidgelen . . . . .	44
2.5.3	Western Blot-Proteintransfer . . . . .	45
2.5.4	Immunodetektion . . . . .	45
2.5.5	Ionenaustauschchromatographie . . . . .	45
2.5.6	Größenausschlusschromatographie . . . . .	46
2.5.7	Immobilisierte Metallionen Affinitätschromatographie (IMAC) . . . . .	46
2.5.8	Photometrische Bestimmung des Proteingehaltes . . . . .	46
2.5.9	Spaltung von Protein mit Faktor Xa . . . . .	47
2.5.10	Bestimmung der Proteinmenge auf SDS-PAGE-Gelen . . . . .	47
2.5.11	Kopplung von Proteinen an NHS-aktivierte Hitrap-Matrix . . . . .	47
2.5.12	Nachweis immobilisierter Zytokine auf Hitrap-Matrix . . . . .	47
2.5.13	TraO-Kopplungsversuche an immobilisiertes TraN-Fusionsprotein . . . . .	48
2.5.14	Anreicherung von TraN-Fusionsproteinen über TraO-Agarose-Beads . . . . .	50
2.5.15	Messung der Fluoreszenzintensität in wässriger Lösung . . . . .	52
2.5.16	Erzeugung von TraO/HRP-Konjugaten . . . . .	52
2.6	Statistik . . . . .	52
3	Ergebnisse . . . . .	53
3.1	Herstellung der TraO/TraN Bindedomänen und Entwicklung optimierter Derivate für die biotechnologische Anwendung . . . . .	53
3.1.1	Klonierung, Expression und Aufreinigung von TraO . . . . .	53
3.1.2	Klonierung, Expression und Aufreinigung von TraN-Fusionsprotein aus <i>E. coli</i> . . . . .	55
3.1.3	Modifizierung des TraO-Moleküls zur Verringerung der Selbstassoziation . . . . .	57
3.1.4	Minimierung des TraN-Bindemotivs für technologische Anwendungen . . . . .	60
3.1.5	Identifikation einer zusätzlichen Faktor Xa-Spaltstelle im TraN-Peptid . . . . .	61
3.2	Charakterisierung der Bindungseigenschaften der TraN- und TraO-Derivate . . . . .	63
3.2.1	Funktionelle Überprüfung des rekombinant erzeugten TraO . . . . .	63

3.2.2	Evaluierung der Bindungsintensitäten der erzeugten TraN-Varianten gegenüber TraO-SQE . . . . .	64
3.2.3	Evaluierung des Bindeverhaltens der TraN-Derivate gegenüber TraO-SQE (Anreicherung von TraN-Fusionsproteinen mit TraO-Gelmatrix) . . . . .	66
3.3	TraN zur affinitätschromatographischen Reinigung rekombinanter Fusionsproteine am Beispiel humaner Zytokine aus <i>E. coli</i> . . . . .	68
3.3.1	Anreicherung von TraN-Fusionsprotein als Bestandteil eines komplexen Proteingemisches an einer TraO-Matrix . . . . .	68
3.3.2	Identifizierung der Elutionsbedingungen zur Aufhebung der reversiblen TraO/TraN-Interaktion . . . . .	69
3.3.3	Bindekapazität der TraO-Matrix . . . . .	71
3.3.4	Wiederverwendbarkeit der TraO-Matrix . . . . .	72
3.3.5	Steigerung der Expressionsausbeuten schlecht exprimierbarer Zytokine durch die N-terminale Fusion von TraN . . . . .	73
3.3.6	Realisierung einer hochspezifischen Aufreinigung von TraN-Zytokin-Fusionsproteinen	75
3.3.7	Aktivität von TraN-markierten Zytokinen am Beispiel des TraN-FX-hM-CSF-Reporterassays . . . . .	76
3.4	Das TraO/TraN-System als neuer Zugang zur effizienten und zielgerichteten Markierung von Proteinen . . . . .	77
3.4.1	TraO-Fluoreszenzprotein-Hybride zur Markierung TraN-fusionierter Rezeptoren .	77
3.4.2	Nachweis von immobilisierten Zytokinen mit TraN-markierten Rezeptoren und TraO-Fluoreszenzprotein-Hybriden per Durchflusszytometrie . . . . .	80
3.4.3	Nachweis von TraN-markierten Zelloberflächenproteinen per Durchflusszytometrie	82
3.4.4	Nachweis von TraN-getaggten Zelloberflächenproteinen per Fluoreszenzmikroskopie	86
3.4.5	Implementierung einer spezifischen Disulfidbrücken-Bildung innerhalb des TraO-TraN-Kopplungskonzeptes zur Herstellung kovalent verknüpfter Protein-Konjugate	86
3.4.6	Nachweis von TraN-Fusionsproteinen im Western Blot durch HRP-TraO-Konjugate	89
4	Diskussion	90
4.1	Herstellung und Optimierung der TraO-Derivate für die biotechnologische Anwendung . .	90
4.2	Herstellung und Optimierung der TraN-Bindedomänen für die biotechnologische Anwendung	91
4.3	Elution . . . . .	95
4.4	TraN zur affinitätschromatographischen Reinigung rekombinanter Zytokine aus <i>E. coli</i> . .	96
4.5	Markierung löslicher Rezeptorketten . . . . .	98
4.6	Markierung von TraN auf Zelloberflächen . . . . .	100
4.7	Implementierung einer spezifischen Disulfidbrücken-Bildung innerhalb des TraO/TraN-Kopplungskonzeptes zur Herstellung kovalent verknüpfter Protein-Konjugate . . . . .	100
4.8	Nachweis der TraO/TraN-Interaktion im Western Blot und alternative Nachweismethoden	101
4.9	Weitere Applikationen . . . . .	101
5	Literaturverzeichnis	102

---

6	Anhang	119
6.1	Abkürzungen . . . . .	119
6.2	Plasmide . . . . .	122
6.3	Primer . . . . .	125
6.4	Restriktionsenzyme . . . . .	127
6.5	Proteineigenschaften . . . . .	128
6.6	DNA-Sequenzen . . . . .	129
6.7	Danksagung . . . . .	134
6.8	Lebenslauf . . . . .	135
6.9	Selbstaendigkeitserklärung . . . . .	136
6.10	Promotionserklärung . . . . .	137
6.11	L <sup>A</sup> T <sub>E</sub> X . . . . .	138

---

## Abbildungsverzeichnis

---

1	Modell des <i>A. tumefaciens</i> VirB/D4-T4SS . . . . .	17
2	Proteinstrukturmodell des in der äußeren Membran vorkommende Teil des T4SS . . . . .	19
3	Proteinstrukturmodelle der beschriebenen TraO <sub>CT</sub> /TraN-Interaktion . . . . .	20
4	Strukturmodelle der beschriebenen TraO <sub>CT</sub> /TraN-Interaktion . . . . .	20
5	SDS-PAGE der Expression und Lokalisation des Zielproteins TraO-126 . . . . .	53
6	Chromatogramm der Aufreinigung von TraO-126 in einem CM-Kationentauscher . . . . .	54
7	SDS-PAGE der chromatographischen Aufreinigung von TraO-126 . . . . .	54
8	Schematischer Aufbau des Fusionsproteins TraNfull-TEV-GFP-HIS . . . . .	55
9	Chromatogramm der TraNfull-GFP Aufreinigung in der IMAC . . . . .	55
10	SDS-PAGE der Induktion und Aufreinigung des Zielproteins TraNfull-GFP in <i>E.coli</i> BL21(DE3) . . . . .	56
11	Aminosäuresequenzen der verschiedenen TraO-Varianten . . . . .	57
12	Proteinstrukturmodell der verschiedenen TraO-Varianten . . . . .	57
13	SDS-PAGE der TraO-Varianten . . . . .	58
14	Chromatogramm der SEC von TraO-126 . . . . .	59
15	Chromatogramm der SEC von TraO-SQE . . . . .	59
16	Chromatogramm der SEC von TraO-S7C . . . . .	59
17	Schematischer Aufbau des TraNfull-GFP-Fusionsproteins . . . . .	60
18	Aminosäuresequenzen der verschiedenen TraN-GFP-Fusionsproteine . . . . .	61
19	Proteinstrukturmodell von interagierendem TraO . . . . .	61
20	SDS-PAGE der Spaltung des TraNfull-GFP-Fusionsproteins mit Faktor Xa . . . . .	62
21	SDS-PAGE der Spaltung des TraNshortC-GFP-Fusionsproteins mit Faktor Xa . . . . .	62
22	Komponenten des TraO-Pull-Down auf Ni-NTA-Matrix . . . . .	63
23	Darstellung der molaren Verhältnisse im TraO-Pull-Down-Experiment . . . . .	64
24	Darstellung der densitometrisch ermittelten Bandenintensitäten in Abhängigkeit der aufgetragenen Proteinmengen . . . . .	65
25	Vergleich der Bindungsintensitäten der TraN-Varianten gegenüber TraO-SQE . . . . .	65
26	Darstellung der Fluoreszenzintensitäten der TraN-GFP-Derivatlösungen vor und nach Inkubation mit TraO-SQE-Matrix . . . . .	67
27	SDS-PAGE der Extraktion von TraNfull-GFP an TraO-Matrix aus einem <i>E.coli</i> BL21(DE3)-ZL . . . . .	68
28	Vergleich der Fluoreszenzintensitäten für die Elution von TraNfull-GFP mit verschiedenen Puffern . . . . .	71
29	Bestimmung der Bindekapazität der TraO-Matrix . . . . .	72
30	Evaluierung der Wiederverwendbarkeit der TraO-Matrix . . . . .	73
31	Schematischer Aufbau eines TraN-markierten Zytokins . . . . .	74
32	Vergleich der Expressionsausbeuten wildtypischer und modifizierter Zytokine . . . . .	74
33	SDS-PAGE der Aufreinigung von TraNfull getagten Zytokinen . . . . .	75
34	Bestimmung der biologischen Aktivität von TraNfull-FX-hM-CSF im Vergleich zu hM-CSF . . . . .	76
35	Schema einer löslichen Rezeptorkette mit C-terminalem TraN . . . . .	77

---

36	Schematischer Aufbau eines TraO-TFP-TraO-Fluoreszenzproteins . . . . .	78
37	Komponenten für den Nachweis der Bindung eines Zytokins bei gleichzeitiger TraO-TFP-TraO-Bindung an den komplementären, TraN-markierten, löslichen Rezeptor . . . . .	78
38	SDS-PAGE für den Nachweis der Bindung des mM-CSF-Zytokins bei gleichzeitiger TraO-TFP-TraO-Bindung an den löslichen Rezeptor mc-FMSR-TraN . . . . .	79
39	SDS-PAGE für den Nachweis der Bindung des hTSLP-Zytokins bei gleichzeitiger TraO-TFP-TraO-Bindung an den löslichen Rezeptor hTSLPRa-TraN . . . . .	79
40	Schema des experimentellen Ablaufes der Detektion von immobilisierten Zytokinen auf Agarosematrix . . . . .	80
41	Histogramm der FACS-Analyse proteingekoppelter Agarose-Beads . . . . .	81
42	Histogramm der FACS-Analyse proteingekoppelter Agarose-Beads . . . . .	82
43	Schema der Proteinkonstrukte für die HEK-Oberflächenexpression . . . . .	83
44	Schematischer Versuchsablauf für den Nachweis von TraN-Zelloberflächenproteinen auf HEK293T-Zellen . . . . .	83
45	Density Blots der FACS-Analyse zum Nachweis von TraN auf HEK293T-Zellen. . . . .	85
46	Fluoreszenzmikroskopie-Aufnahmen von HEK293T-Zellen . . . . .	86
47	Modell der Proteinstruktur zur Insertion von Cystein-Resten in TraNfull und TraO-SQE . . . . .	87
48	Aminosäuresequenzvergleich zur Insertion von Cystein in TraO-SQE . . . . .	87
49	Aminosäuresequenzvergleich zur Insertion von Cystein in TraNfull . . . . .	87
50	SDS-PAGE der Ko-Inkubation von TraO-SQE-G95C und TraNfull-P10C-TEV-GFP-HIS . . . . .	88
51	Western Blot zum Nachweis der acht verschiedenen TraN-Varianten mit TraO-HRP . . . . .	89
52	Plasmidkarte pRSET-5b . . . . .	122
53	Plasmidkarte pcDNA3.1-Zeo(-) . . . . .	122
54	Plasmidkarte peGFP-N1 . . . . .	123
55	Plasmidkarte mTFP-N1 . . . . .	123
56	Plasmidkarte Salmonella enterica subsp. enterica serovar Typhimurium Plasmid R46 . . . . .	124
57	Die DNA-Sequenzen der verschiedenen TraO-Varianten . . . . .	130
58	Die DNA-Sequenz des verwendeten Fusionsproteins mit TraN-Volllängenvariante. Siehe 3.1.2 . . . . .	130
59	Die DNA-Sequenzen der verschiedenen TraN-Varianten . . . . .	130
60	Die DNA-Sequenzen der ungelabelten Zytokine . . . . .	131
61	Die DNA-Sequenzen der TraN-markierten Zytokine . . . . .	131
62	Die DNA-Sequenz der TraN-markierten hTSLP-Rezeptor $\alpha$ -Kette . . . . .	132
63	Die DNA-Sequenz des TraN-markierten mc-FMS-Rezeptors . . . . .	132
64	Die DNA-Sequenzen der verschiedenen TraNshortNC-T21A-markierten Zytokine für die Expression auf HEK293T-Zellen . . . . .	133

---

## Tabellenverzeichnis

---

1	RNA-Primer-Mischung . . . . .	37
2	Mastermix reverse Transkription . . . . .	37
3	Standardansatz präparative PCR . . . . .	38
4	Standardansatz Kolonie-PCR . . . . .	38
5	Standard PCR-Programm . . . . .	39
6	Standard-Restriktionsverdau für PCR-Fragmente und Plasmid-DNA . . . . .	39
7	Ligationsansatz für die Ligation von DNA-Fragmenten mittels T4-Ligase . . . . .	40
8	SDS-PAGE Standardansatz für zwei 17,5 %ige SDS-PAGE-Gele . . . . .	44
9	Übersicht zu TraO-Kopplungsversuchen an Ni-NTA-Agarose . . . . .	49
10	Übersicht zu Anreicherung von TraN-Fusionsproteinen an TraO-Agarosematrix . . . . .	51
11	Vergleich der Peaks aus den drei Chromatogrammen der SEC . . . . .	60
12	Vergleich der Fluoreszenzintensitäten für die Elution der verschiedenen TraN-GFP-Derivate . . . . .	69
13	Die verwendeten Primer, die palindromischen Erkennungssequenzen für Restriktionsenzyme sind unterstrichen. . . . .	125
14	Die verwendeten Primer, die palindromischen Erkennungssequenzen für Restriktionsenzyme sind unterstrichen. . . . .	126
15	Die verwendeten Restriktionsenzyme, die Spaltstellen sind markiert . . . . .	127
16	Die molaren Extinktionskoeffizienten $\varepsilon$ und die Molekulargewichte $M_r$ aller hergestellten rekombinanten Proteine . . . . .	128
17	Die Accession-Nummern der verwendeten DNA . . . . .	129

---

## 1 Einleitung

---

Die meisten - wenn nicht sogar alle - zellulären Prozesse unseres Lebens werden durch molekulare Interaktionen gesteuert. Ein überraschendes Ergebnis der verschiedenen Genomsequenzierungsprojekte war, dass die Komplexität eines Organismus nicht durch die Anzahl seiner Gene bestimmt wird [1] [2]. Einerseits ist diese Zahl für den Menschen viel geringer als ursprünglich angenommen. Andererseits besitzen beispielsweise *Caenorhabditis elegans* (Fadenwurm) oder *Daphnia pulex* (Wasserfloh) mehr Gene als der Mensch [3] [4]. Folglich ist die Vielschichtigkeit von Organismen viel mehr von der Anzahl ihrer molekularen, physiologisch relevanten Interaktionen abhängig [5]. Um das Gesamtnetzwerk der molekularen Wechselwirkungen in einer Zelle zu beschreiben, wurde in den letzten Jahren der Begriff des Interaktoms geprägt [6] [7]. Oft wird der Begriff auf proteomweite Interaktionsstudien bzw. -netzwerke eingeschränkt, was die Bedeutung der spezifischen physischen Interaktionen zwischen Proteinen hervorhebt. Die Art und Weise wie hunderte, manchmal tausende dieser unterschiedlichen biologischen Makromoleküle miteinander verbunden sind, ist ausschlaggebend für ihre Funktion und den Phänotyp einer Zelle. Die Gesamtheit der Protein-Protein-Interaktionen (PPI) wird im menschlichen Organismus auf etwa 650 000 Wechselwirkungen geschätzt [8] [9], von denen jedoch nur ein Bruchteil bekannt ist [10]. PPI spielen eine Schlüsselrolle bei fast allen biologischen Prozessen. Folglich sind diese Wechselwirkungen Gegenstand der Forschung in vielen Bereichen der Biowissenschaften. Beispiele für PPI sind die Signaltransduktion, der Transport von Protein durch Membranen, der Zellmetabolismus und die Muskelkontraktion. Auch unvollständige Protein-Netzwerke sind eine wertvolle Basis für weiterführende Studien geworden. Viele Proteine, die mit Krankheitsprozessen in Verbindung gebracht werden, konnten so identifiziert werden [11]. Die Aufklärung vollständiger Netzwerke für menschliche Zellen stellt einen Weg zur Entschlüsselung von Stoffwechselprozessen, Signalwegen und Krankheitsursachen dar. Es gibt zahlreiche Methoden zum Studium von PPI. Neben dem Hefe-Zwei-Hybrid-System [12] ist die Tandem Affinity Purification [13] [14] eine der am häufigsten verwendeten Methoden, um Interaktionen zwischen Proteinen zu erforschen. Dabei wird das Zielprotein mit einem Anhängsel, einem sogenannten Tag oder Label, fusioniert und kann so spezifisch identifiziert bzw. aus einem Gemisch vieler verschiedener Moleküle aufgereinigt werden. Auch andere Systeme zum Nachweis von Makromolekülen oder der Isolierung rekombinanter Proteine aus komplexen Stoffgemischen bedienen sich solcher Anhängsel. Meist nutzt man bereits bekannte PPI und bedient sich der nicht-kovalenten Wechselwirkung der Aminosäurereste oberflächennaher Domänen zwischen den beteiligten Molekülen.

---

## 1.1 Hochspezifische Proteinbindungen und ihre Anwendungen

---

In vielen medizinischen, biochemischen und biotechnologischen Bereichen werden PPI genutzt um Moleküle oder Strukturen zu markieren oder sie voneinander zu separieren. Die wichtigsten Moleküle stellen dabei Antikörper dar. Antikörper, Eiweiße aus der Klasse der Globuline, werden in den B-Lymphozyten von Vertebraten als Reaktion auf Antigene produziert und für verschiedenste Zwecke eingesetzt. Als passiver Impfstoff, zur Substitutionsbehandlung bei angeborenen oder erworbenen Störungen der Antikörperbildung [15], in der Onkologie [16], in der Szintigrafie bzw. der Positronen-Emissions-Tomographie zur Detektion von Tumoren [17] und vielen anderen Bereichen werden monoklonale Antikörper und somit PPI seit teilweise mehr als einhundert Jahren genutzt, um Antigene oder Zellen spezifisch zu markieren. Auch kommen Antikörper in vielen biochemischen Analyse- und Aufreinigungsverfahren zum Einsatz. Anwendungsbeispiele sind der Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA), die Durchflusszytometrie, das Phagen-Display, der Pull-Down-Assay, der Western Blot, die Immunhistochemie, die Fluoreszenzmikroskopie oder die Affinitätschromatographie. Die meisten genannten Verfahren können alternativ, statt mit Antikörpern, auch mit einer Fülle unterschiedlicher Tags durchgeführt werden. Wesentliche Vorteile dieser Label gegenüber Antikörpern sind ihre oftmals geringere Größe, die Herstellungsmöglichkeit in prokaryontischen Systemen und die vereinfachte Verwendung in Fusionsproteinen. Heutzutage sind Antikörper und Label nicht ersetzbar. Obwohl beispielsweise die Bio-Layer-Interferometrie (ForteBio) [18] als Label-freie Methode zur Identifizierung von Interaktionen gilt, müssen die zu untersuchenden Zielproteine erst einmal immobilisiert werden. Dies geschieht teilweise auch über verschiedene Antikörper, Glutathion-S-Transferase (GST), Protein A, Protein G, Protein L oder Streptavidin, wodurch diese Methode ebenfalls zu einer Antikörper bzw. Tag-basierten wird.

---

### 1.1.1 Das Prinzip der Proteinbindung / Wechselwirkungen

---

Proteine sind lineare Polymere, deren monomere Untereinheiten die Aminosäuren sind. Die Funktionen und Eigenschaften eines Proteins ergeben sich aus seiner dreidimensionalen Struktur und somit unmittelbar aus der Aminosäuresequenz und den verschiedenen funktionellen Gruppen der einzelnen Aminosäuren. Die Polypeptidketten falten sich dabei weitestgehend so, dass die hydrophoben Seitenketten im Inneren und hydrophile Seitenketten an der Oberfläche des Proteins liegen. Dabei kommt es zur Ausbildung von sekundären Strukturen, d. h. die räumliche Anordnung der aufeinanderfolgenden Aminosäuren, wie  $\alpha$ -Helices,  $\beta$ -Faltblättern, Haarnadelkehren und Schleifen. Mittels Kernspinresonanzspektroskopie [19], Röntgenkristallographie [20] und Kryoelektronenmikroskopie [21] kann die dreidimensionale räumliche Anordnung der Polypeptidkette (Tertiärstruktur) von Proteinen und Proteinkomplexen visualisiert und simuliert werden. Eine PPI ist ein spezifischer physischer Kontakt zwischen zwei oder mehr Proteinen. Wenn die Oberflächenmoleküle der Interaktionspartner (Domänen) komplementär zueinander passen, bilden sie untereinander eine Reihe von meist nicht-kovalenten Bindungen aus, wie Wasserstoffbrücken, ionische Wechselwirkungen, Van-der-Waals Kräfte und hydrophobe Wechselwirkungen. Dabei kann ein Protein bei dem anderen bzw. beide gegenseitig Konformationsänderungen verursachen. Generell können diese Wechselwirkungen in stabile und transiente eingeteilt werden. Stabile Interaktionen sind meist Komplexe aus mehreren Untereinheiten wie z. B. Hämoglobin oder RNA-Polymerase. Transiente Interaktionen variieren erheblich in Ausmaß und Zeit ihrer Bindung und Dissoziation. Transient interagierende Proteine sind involviert in ein breites Spektrum zellulärer Prozesse wie DNA-Replikation,



---

Transkription, Translation, Splicing, Sekretion, die Kontrolle des Zellzyklus, Signaltransduktion und metabolische Prozesse [22].

---

### 1.1.2 Affinitätstags zur Nutzung in der Chromatographie und Detektion

---

Zusammengehörige "Partner" erkennen sich gegenseitig und können miteinander interagieren, also in Wechselwirkung treten. Um daraus einen Nutzen zu ziehen, kommt es letztlich darauf an, sich der spezifischen Erkennungsmuster, welche die Partner biologischer Reaktionen auszeichnen, zu bedienen. Die Affinitätschromatographie nutzt eine spezifische biologische Eigenschaft einer Komponente eines Stoffgemisches aus, um diese zu isolieren. Dabei wird der biospezifische Partner oder Ligand der Komponente an eine stationäre Phase oder Sorbens oder Matrix immobilisiert. An der daraus entstandenen stationären Phase wird die mobile Flüssigphase mit dem zu trennenden Stoffgemisch vorbei geleitet. Dabei erkennt der fixierte Ligand nur die spezifisch zu ihm passende Komponente (Analyt) und hält diese zurück, er fängt sie ein, während alle anderen Komponenten mit der Flüssigphase abtransportiert werden können. Die treibende Kraft hinter der Entwicklung von Protein-Tag-Systemen ist das Ziel, mit einfachen und möglichst wenigen chromatographischen Schritten eine große Menge spezifischer rekombinanter Proteine zu isolieren. Ein weiterer wichtiger Aspekt ist neben der Reinigung auch die Detektion von Biomolekülen. Die Tags werden dazu verwendet, ein Protein von Interesse zu lokalisieren. Mittels molekularbiologischer Methoden ist es heutzutage möglich Fusionsproteine zu produzieren, die aus dem zu untersuchenden Protein und verschiedenen Tags zur Detektion und Aufreinigung zusammengesetzt sind. Viele unterschiedliche Protein-Tag-Systeme sind beschrieben und werden heute standardmäßig verwendet. Die Art und Größe von Affinitätstags variiert. Sie können aus wenigen Aminosäuren, Epitopen oder ganzen Proteinen aufgebaut sein und an das N- oder C-terminale Ende der Aminosäuresequenz fusioniert werden [23] [24]. Auch die bereits erwähnte TAP ist eine affinitätschromatographische Methode mit mehreren aufeinander folgenden Tags.

---

### 1.1.3 Anforderungen an Affinitätstags

---

Die Herstellung und Isolierung hochreiner rekombinanter Proteine ist eine der Hauptaufgaben der Proteinbiochemie. Die Affinitätschromatographie ist ein chromatographisches Trennverfahren zur Isolierung eines Analyten (Substrat, Zielprotein) aus einer Proteinlösung. Dem interessierenden Analyten muss dafür ein Ligand (Bindungspartner) zur Verfügung stehen. Es wurde eine Vielzahl an Peptiden und Proteinen entwickelt, die dem Zielprotein angehängt werden können und ihm dadurch bestimmte Eigenschaften verleihen. Diese sogenannten Affinitätstags haben i. d. R. folgende Eigenschaften [24] [25]:

- ⇒ Einstufige Adsorptionsaufreinigung
- ⇒ Minimaler Effekt auf die Tertiärstruktur und die biologische Aktivität des Zielproteins
- ⇒ Effektive und spezifische Entfernung des Affinitätstags vom nativen Protein
- ⇒ Die Möglichkeit akkurater Analysen des rekombinanten Proteins
- ⇒ Übertragbarkeit der Systems auf unterschiedliche Proteine
- ⇒ Stabilität des Tags
- ⇒ Einfache Herstellung
- ⇒ kostengünstige Herstellung von Matrix und Puffer

---

Mit Hilfe eines Affinitätstags kann aus einem komplexen Stoffgemisch das Substrat reversibel an den Liganden, welcher kovalent an eine Matrix gekoppelt ist, gebunden werden. Es handelt sich um eine biospezifische Adsorption. Das fundamentale Prinzip der reversiblen Interaktion zweier biologisch aktiver Substanzen war bereits zu Beginn des zwanzigsten Jahrhunderts bekannt. Wesentlich vorangetrieben wurden die Entwicklung affinitätschromatographischer Trennmethoden in den 1960iger Jahren nach der Entdeckung von Sephadex [26] und Agarose [27] als Trägermaterial. Die Interaktionsstudien zwischen Substrat und Ligand konnten so entscheidend beschleunigt werden und so steht heute eine Vielzahl unterschiedlicher Tags zur Verfügung, von denen die in unserem Labor verwendeten kurz vorgestellt werden.

---

#### 1.1.4 Vergleich verschiedener Affinitätstags - Vor- und Nachteile

---

##### Der Strep-Tag

Der Strep-Tag ist ein Oktapeptid zur Bindung von Fusionsproteinen an Streptavidinmatrices [28]. Durch Mutagenese wurde ausgehend vom ursprünglichen Tag das Strep-Tag II und aus Streptavidin das Strep-Tactin entwickelt [29] [30] [31]. Zielproteine mit einem Strep-tag bzw. dem Strep-Tag II binden unter physiologischen Pufferbedingungen an der Biotin-Bindungsstelle und können mit Biotin oder Biotinderivaten von der Matrix eluiert werden [28]. Die Matrix ist regenerierbar. Die Bindung ist hochspezifisch und die Dissoziationskonstante liegt im Bereich von 1  $\mu\text{M}$  [30]. Der Strep-Tag kann C- und N-terminal an Proteine fusioniert werden und Strep-Tag-Hybride können in Bakterien [30], Säugerzellen [32], Hefen [33], Pflanzen- und baculovirusinfizierte Insektenzellen [34] [35] exprimiert werden. Neben seiner Nutzung zur Proteinaufreinigung kann der Strep-Tag auch zum Nachweis verschiedener Moleküle dienen. Dazu wird Strep-Tactin beispielsweise mit einem enzymatischen (Meerrettichperoxidase, HRP; Alkalische Phosphatase, AP) oder fluoreszierenden (grün fluoreszierendes Protein, GFP) Marker gekoppelt. Der Tag kann so in Colony Blot, Dot Blot, Western Blot, ELISA, Proteinlokalisierung oder Targetstudien eingesetzt werden. Der Strep-Tag ist auch im denaturierten Zustand nachweisbar.

##### Polyhistidin-Tag

In den 1980iger Jahren wurde die immobilisierte Metallaffinitätschromatographie (IMAC) verwendet um Polyhistidin-getaggte (His-Tag) Proteine aufzureinigen [36]. Metallionen wie  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$  und  $\text{Zn}^{2+}$  werden an einem Trägermaterial fixiert und können so die Elektronendonorguppen im Imidazolring des Histidin binden, längere His-Tags binden i. d. R. besser an IMAC [37]. Durch die Zugabe von freiem Imidazol oder eine Änderung des pH-Wertes können die Proteine eluiert werden. Bei niedrigen Imidazolkonzentrationen werden die unspezifisch gebundenen Wirtsproteine ausgewaschen. Polyhistidin kann auch unter denaturierenden Bedingungen und in Anwesenheit von Salzen verwendet werden. Die Elution mit Imidazol kann jedoch eine folgende Kernspinresonanzspektroskopie, Kristallographie oder Konkurrenzstudien beeinflussen, außerdem neigen viele Proteine dazu in Anwesenheit von Imidazol zu aggregieren. Der His-Tag kann N- und C-terminal und sogar internal verwendet werden und eine Vielzahl rekombinanter Proteine aus Bakterien [38], Hefen [39] Säugerzellen [40] und baculovirusinfizierte Insektenzellen [41] wurden mit seiner Hilfe hergestellt. Trotz der geringen Größe des Polyhistidin-Tags kann

---

nicht ausgeschlossen werden, dass Wechselwirkung mit dem Protein eingegangen werden. [42]. Das Problem kann umgangen werden, indem man den Affinitätstag an eine andere Position in der Proteinkette kloniert oder unter denaturierenden Bedingungen reinigt. Außerdem sind Aufreinigung von Proteinen mit Metallzentrum und unter anaeroben Bedingungen mit His-Tag nicht empfohlen. Trotzdem ist die Reinigung von Proteinen mittels Polyhistidin eine der gebräuchlichsten Methoden [24].

### FLAG-Tag

Der FLAG-Tag besteht aus einer hydrophilen Peptidsequenz von acht Aminosäuren. Dieser Epitop-tag bindet an verschiedene monoklonale Antikörper [43]. Einige Studien zeigen, dass bereits ein noch kürzerer Abschnitt aus dem Tag (4 Aminosäuren) an besagte Antikörper bindet [44]. Der FLAG-Tag kann N- [45] oder C-terminal [46] fusioniert sein und sogar gemeinsam mit anderen Tags verwendet werden [47]. Er stört dabei weder bei der Proteinexpression oder der Aktivität der Fusionsproteine. Untersuchungen wurden in Bakterien [48], Hefe [49], Säugerzellen [50] und Insektenzellen [51] durchgeführt. Ein Vorteil ist, dass der Tag eine interne Spaltstelle für das proteolytische Enzym Enterokinase besitzt [43]. Die Proteine werden im nativen Zustand an den immobilisierten FLAG-Antikörper gebunden und können nach dem Waschen mit EDTA [52], niedrigem pH-Wert [53] oder kompetitiv eluiert werden [54]. Zwei Nachteile des Systems sind die instabile Antikörpermatrix und die Tatsache, dass der Tag nicht unter denaturierenden Bedingungen verwendet werden kann [24].

### P5D4-Tag

Der P5D4-Tag ist ein 11-15 Aminosäuren langes Peptid, welches aus dem C-Terminus des *Vesicular stomatitis Indiana virus* Glykoprotein entwickelt wurde [55]. Gegen die Peptidsequenz wurden monoklonale Antikörper hergestellt. Der Tag ist nicht besonders verbreitet und auch in der Literatur finden sich keinen nennenswerten Aufzeichnungen. Nichtsdestotrotz bieten verschiedene Firmen einen konjugierten Antikörper gegen den Tag an und er wird standardmäßig in unserem Labor zum Nachweis der Expression im Western Blot verwendet. Eine Nutzung für die Affinitätschromatographie ist nicht beschrieben.

### GST-Tag

Die GST aus *Schistosoma japonicum* ist ein 26,2 kDa großes Enzym [56], was im Vergleich zu den bisher vorgestellten Tags sehr groß ist. Der Tag ist N-terminal an Zielproteine fusioniert und wird lediglich in Bakterien verwendet. Vorteil von GST als Fusionstag ist, dass es als eine Art Chaperon die Proteinfaltung des Zielproteins fördert und folglich das Protein in großer Menge als lösliches Molekül statt in Einschlusskörperchen (Inclusion Bodies, IB) exprimiert wird [57]. GST-Fusionsproteine können i. d. R. einfach ohne Denaturierung oder den Einsatz von Detergenzien aufgereinigt werden. Dazu wird das GST-Substrat Glutathion (GSH) an einer stationären Phase immobilisiert und kann mit freiem GSH eluiert werden [56]. Kommerziell erhältliche GST-Tags werden mit einer Vielzahl verschiedener proteolytischer Spaltstellen angeboten, um das Zielprotein von der GST zu lösen. Ist die Spaltung erfolgreich,

---

muss das GST-Tag mittels chromatographischer Methoden vom Zielprotein entfernt werden.

### MBP-Tag

Das Maltose-Bindungsprotein (MBP oder MalE) ist ein 42,5 kDa großes Protein und Teil des Maltose/Maltodextrin-Systems in *E. coli* [58]. Es wird N-terminal an das Zielprotein fusioniert. Wie GST kann MBP die Löslichkeit überexprimierter Fusionsproteine in Bakterien verbessern [59]. Die Fusionsproteine können in einer einstufigen Affinitätschromatographie an eine Amylose-Matrix gebunden werden und werden mit freier Maltose in physiologischen Puffern eluiert [58]. MBP-Tag und Zielprotein müssen anschließend proteolytisch gespalten und voneinander getrennt werden.

### Weitere verbreitete Tags

Die Affinitätschromatographie findet häufig Anwendung in der Antikörperaufreinigung unter Verwendung von Protein A [60] [61] und Protein G [62]. Die meisten monoklonalen Antikörper, die für Diagnostik und Forschung eingesetzt werden und so gut wie alle therapeutischen Antikörper werden mit Hilfe der Affinitätschromatographie aufgereinigt [63], [64]. Die Elution erfolgt bei basischen pH-Werten und der Tag wird mittels IgG-Konjugaten nachgewiesen. Der Polyarginin-Tag (Arg-Tag) [65] besteht aus fünf oder sechs aufeinander folgenden Argininen, die C-terminal an die Aminosäurekette angehängt werden. Da Arginin die basischste Aminosäure ist, können die rekombinanten Proteine mittels Kationenaustauschchromatographie von den meisten Verunreinigungen befreit werden und nach der Aufreinigung kann das Polyarginin mit Carboxypeptidase B entfernt werden [65]. Ein Nachteil des Tags ist die mögliche C-terminale Veränderung der Tertiärstruktur der Fusionsproteine [66], sowie die schwache Ausbeute an korrekt gespaltenem Protein [67]. Der Arg-Tag bindet hochaffin an Oberflächen und gewinnt somit für Interaktionsstudien mit Liganden an Bedeutung [68]. Der Arg-Tag wird nicht oft verwendet, ist aber in Kombination mit einem zweiten Tag ein interessantes Tool zur Proteinreinigung [24].

---

## 1.2 Die Proteine des Typ IV Sekretionssystems

---

Bakterien haben viele verschiedene spezialisierte Sekretions- und Konjugationswege für Virulenzfaktoren, Nährstoffe, Nukleinsäuren und Zelloberflächenmoleküle entwickelt [69]. Das aus multiplen Untereinheiten bestehende Typ IV Sekretionssystem (T4SS) vermittelt die Translokation von Makromolekülen, wie Proteinen und Nukleinsäuren, durch die Zellumhüllung gram-negativer und gram-positiver Bakterien [70] [71]. Meist werden die zu transportierenden Substrate durch direkten Zell-Zell-Kontakt übertragen, obwohl auch deren Sekretion und Aufnahme aus dem extrazellulären Milieu beschrieben ist [72] [73] [74]. T4SS können basierend auf ihrer Funktion in drei Hauptgruppen unterteilt werden [75]: (1) Konjugationssysteme, (2) DNA-Sekretions- oder Aufnahmesysteme, (3) Effektor-Translokationssysteme. Konjugationssysteme vermitteln den Transfer von DNA zu anderen Bakterienzellen [76]. Diese Systeme fördern die bakterielle Genomplastizität und vermitteln dadurch eine rasche Anpassung an wechselnde Umweltbedingungen. Sie sind auch verantwortlich für die Verbreitung von Resistenzgenen unter den Bakterien [77]. T4SS, welche die Sekretion oder Aufnahme von DNA vermitteln, tragen ebenfalls zur Vergrößerung der Genomvielfalt bei [78]. Effektor-Translokationssysteme übertragen Proteine in Eukaryonten [77].

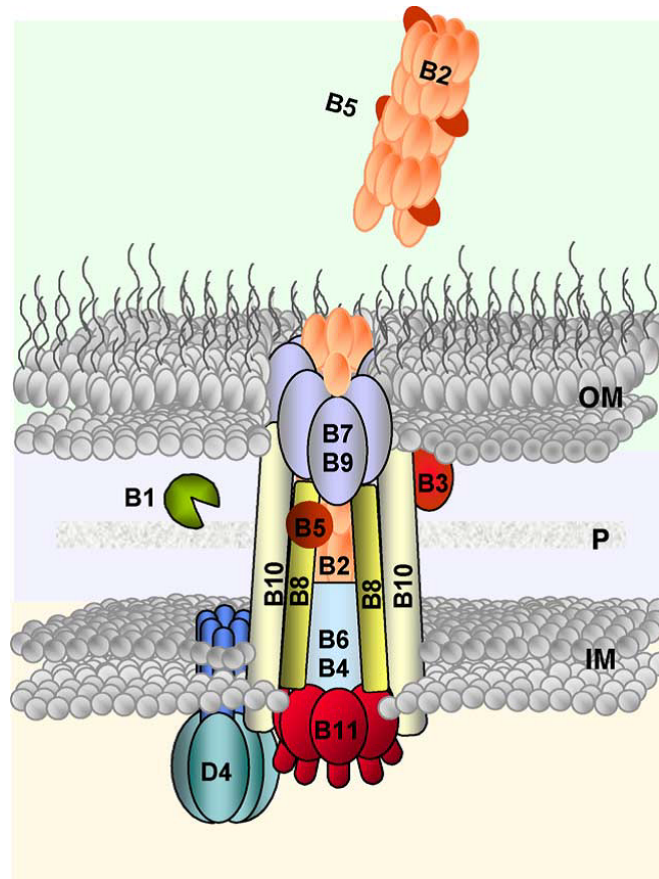


Abbildung 1: Modell des *A. tumefaciens* VirB/D4-T4SS [74]. VirD4 und die VirB-Proteine interagieren miteinander und bilden einen Sekretionskanal und den extrazellulären T-Pilus um Substrattransfer zu realisieren. IM: Innere Membran; P: Periplasma; OM: Äußere Membran.

Als eines der ersten und am besten untersuchten T4SS gilt das VirB/D4-System des *Agrobacterium tumefaciens* [79] [80]. Das *Agrobacterium tumefaciens* VirB/D4-T4SS wird codiert von den VirB- und VirD-Operons [81]. Das VirB-Operon codiert die 11 Gene virB1 bis virB11 [79]. Dessen Proteine realisieren die für den Substrattransfer durch das Periplasma und beide bakteriellen Membranen nötige Kanalstruktur und auch das extrazelluläre Filament, bezeichnet T-Pilus, welches die Verbindung zur Empfängerzelle vermittelt [82]. Das VirD-Operon codiert 5 Gene VirD1 bis VirD5, deren Aufgabe hauptsächlich die Prozessierung des zu transferierenden Substrates ist [79] [83] [82]. VirB4, VirB11 und VirD4 sind ATPasen, welche auf zytoplasmatischer Seite in der inneren Membran (IM) der Zelle vorliegen [84] [85] [75] [86]. VirB3, VirB6 und VirB8 bilden einen Proteinkomplex in der IM [87]. Der extrazelluläre Pilus wird durch VirB2 und VirB5 gebildet [88] [89] und die Proteine VirB7, VirB9 und VirB10 bilden einen sog. Kernkomplex, welcher die IM und die äußere Membran (OM) der Zelle durchspannt [78] [90]. Zwischen den beiden Proteinen VirB7 und VirB9 wurde eine besonders starke Interaktion nachgewiesen. Sie bilden einen heterodimeren Komplex, welcher durch Disulfidbrücken stabilisiert wird und essentiell für das T4SS ist [91] [92] [93]. Die Proteinkomponenten und die genetische Organisation des VirB/D4-Systems haben große Ähnlichkeiten zu anderen funktionell unterschiedlichen T4SS, was ihre evolutionäre Beziehung unterstreicht [94].

---

### 1.2.1 TraO und TraN als Bestandteil des bakteriellen T4SS aus dem Plasmid pKM101

---

Plasmide sind autonom replizierende, meist ringförmige, doppelsträngige DNA-Moleküle, die vor allem in Bakterien und in Archaeen vorkommen können. Ihre Größe beträgt 1 bis über 1 000 kbp [95]. Plasmide können viele verschiedene Gene enthalten, die dem Wirtsorganismus einen Selektionsvorteil verschaffen. pKM101 ist ein 35,4 kbp Plasmid, welches nach in vivo Deletion eines Bereiches des Plasmids R46 aus *Salmonella typhimurium* isoliert wurde [96] [97] [98]. Im Uhrzeigersinn enthält es folgende Regionen [99]: (1) das bla-Gen, welches für  $\beta$ -Lactamase codiert; (2) die Slo-Region, verantwortlich für die Verzögerung des Zellwachstums im Minimalmedium; (3) die tra-Gene, die dem Plasmid eine Konjugation, also den parasexuellen Austausch von Plasmiden zwischen zwei Bakterien ermöglichen; (4) die muc-Gene, verantwortlich für erhöhte UV- und chemisch induzierte Mutagenese in der Zelle; und (5) die Rep-Region zur Plasmidreplikation. T4SS, deren Untereinheiten denen der VirB und VirD4 Genprodukte in Struktur und Anzahl ähneln, werden als Typ IV A Sekretionssysteme bezeichnet [100]. Die tra-Gene von pKM101 wurden als Homologe des VirB7/D4-systems identifiziert [101]. In der Kryoelektronenmikroskopie eines T4SS, welches durch pKM101 codiert wird, konnte gezeigt werden, dass ein 1,05 MDa großer Proteinkomplex die innere und äußere Membran der Bakterienzelle in Form einer zylindrischen Pore durchspannt [102]. Dieser ringförmige, symmetrische Kernkomplex ist aus jeweils 14 Kopien der Proteine TraN (VirB7-Homolog), TraO (VirB9-Homolog) und TraF (VirB10-Homolog) aufgebaut und in Abbildung 2 dargestellt. TraO ist ein 294 Aminosäuren langes Protein mit vorwiegend hydrophilen Eigenschaften, welches im periplasmatischen Raum und der äußeren Membran lokalisiert ist [87]. Das 386 Aminosäuren lange TraF bildet in der äußeren Membran eine einzigartige hydrophobe, doppelhelikale Transmembranregion und durchspannt die gesamte Bakterienzellwand [103]. TraN und die C-terminalen Anteile von TraO (TraO<sub>CT</sub>) und TraF (TraF<sub>CT</sub>) bilden die äußere Schicht des Komplexes und sind in die äußere Membran eingelagert. TraF<sub>CT</sub> liegt dabei im Inneren der Pore, während TraO<sub>CT</sub> und das gesamte TraN peripher darum angeordnet sind [103]. Das 48 Aminosäuren lange Lipoprotein TraN verankert TraO<sub>CT</sub> in der äußeren Membran [102]. Der innere Teil des Kernkomplexes bildet die Transmembrandomäne und verankert den Komplex in der inneren Membran, er besteht aus den N-terminalen Bereichen von TraO und TraF (TraO<sub>NT</sub> und TraF<sub>NT</sub>) [87].

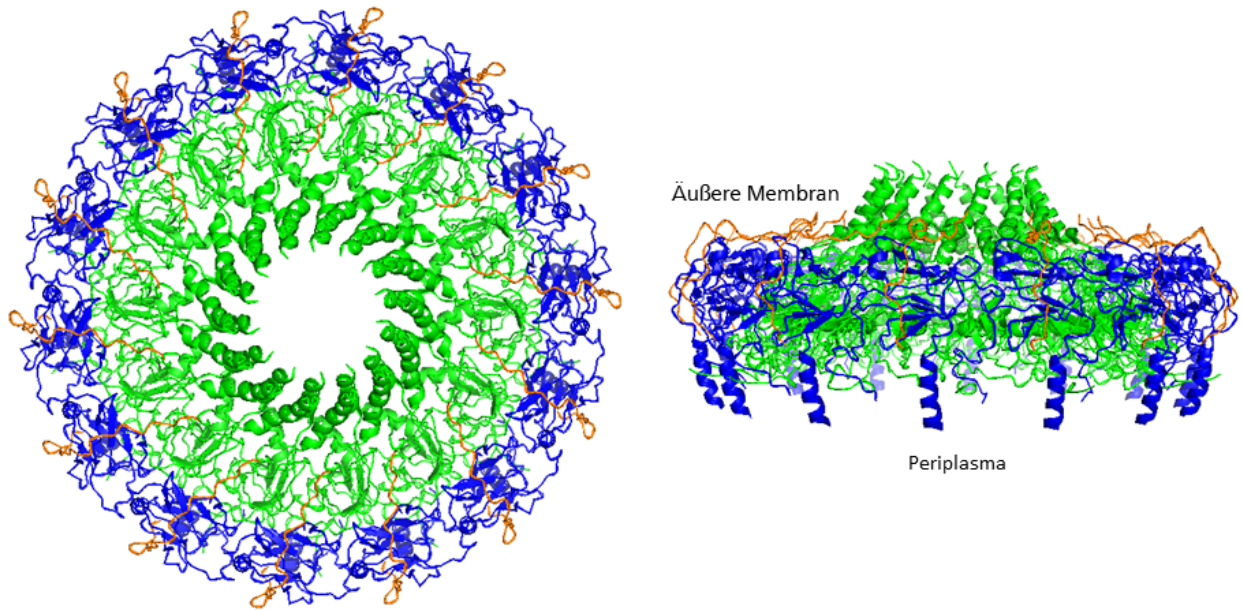


Abbildung 2: Proteinstrukturmodell des in der äußeren Membran vorkommende Teil des T4SS modelliert mit der PyMOL-Software (PDB: 3ZBI). „Ribbon“-Struktur des tetradecamerischen Komplexes und dessen Lage von oben (links) und seitlich (rechts). TraF<sub>CT</sub>, TraO<sub>CT</sub> und TraN in den Farben grün, blau und orange, in genannter Reihenfolge. Rechts ist außerdem die Lokalisierung dargestellt.

Wie bereits beschrieben, interagieren TraO<sub>CT</sub> und TraN spezifisch miteinander. Das lösliche TraO<sub>CT</sub> (AS 177- 290) faltet sich in eine immunglobulinartige Sandwich-Struktur aus 9  $\beta$ -Faltblättern und eine kurze  $\alpha$ -Helix zwischen dem ersten und dem zweiten Faltblatt [104]. Sechs dieser  $\beta$ -Faltblätter ( $\beta$ 1-3,  $\beta$ 7-9) bilden das Gerüst der Sandwich-Struktur, die drei restlichen  $\beta$ -Faltblätter sind auf der gegenüberliegenden Seite des Proteins eher außen vorgelagert [104]. Wie in Abbildung 3 zu erkennen, windet sich TraN (AS 17- 48) um diese Faltblattstruktur und interagiert besonders mit  $\beta$ 1, sowie  $\beta$ 2,  $\beta$ 9 und einigen Aminosäuren der Linkerregion zwischen  $\beta$ 1 und  $\beta$ 2 [104]. Die erste identifizierte Interaktion zwischen TraN und TraO<sub>CT</sub> findet zwischen den Kohlenstoffatomen von P23, E24 und P25 (TraN) und M192, V261 und G263 (TraO<sub>CT</sub>) statt [104]. Die Aminogruppe von D26 (TraN) bildet eine Wasserstoffbrückenbindung mit Q189 (TraO<sub>CT</sub>), W27 (TraN) füllt den Raum („packs on a shelf comprising“) zwischen G263, R265 und V185 (TraO<sub>CT</sub>) [104]. S28, N29 und Y30 bilden eine Kehre im TraN-Peptid und positionieren so die Amino- und die Hydroxygruppe des Peptidrückgrates von V31, damit diese Wasserstoffbrücken mit den M186 (TraO<sub>CT</sub>) eingehen [104]. P32 (TraN) positioniert V33 (TraN) so, dass dessen Seitenkette tief in eine hydrophobe Tasche zwischen den Faltblättern  $\beta$ 1 und  $\beta$ 2 von TraO<sub>CT</sub> und den Aminosäuren Y184, M186 und V200 eingefügt wird [104]. Im HSQC (Heteronuclear Single Quantum Correlation) Spektrum wurde außerdem festgestellt, dass die Seitenkette von N34 (TraN) eine Wasserstoffbrücke bildet, welche allerdings keiner TraO<sub>CT</sub>-Aminosäure zugeordnet werden konnte [104]. In einem Sequenzalignment wurde gezeigt, dass das TraN-Motiv „P-V-N-K“ ein hochkonserviertes Motiv in den Homologen des T4SS ist [104].



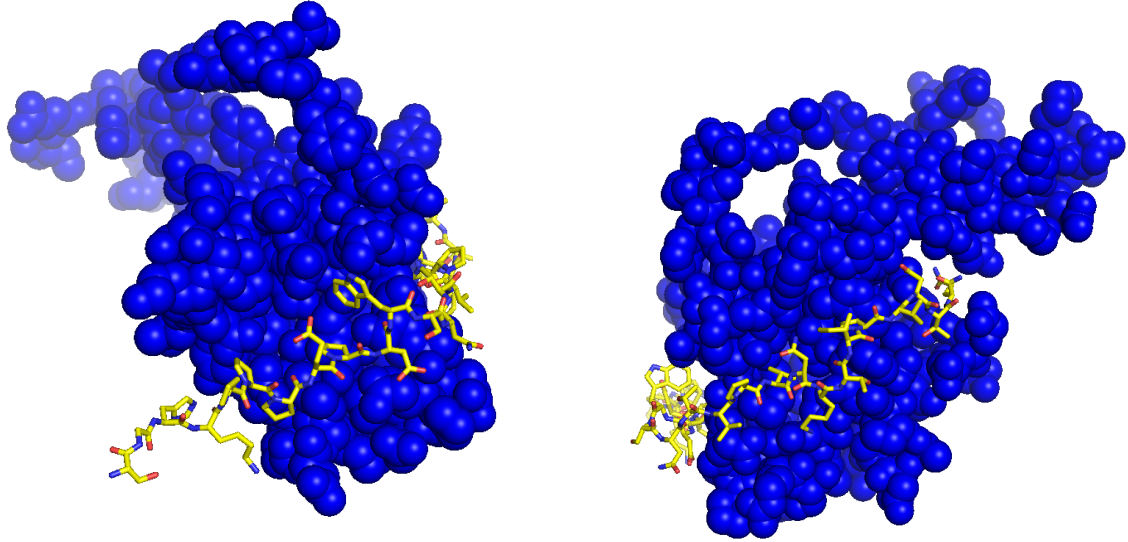


Abbildung 3: Proteinstrukturmodelle der beschriebenen TraO<sub>CT</sub>/TraN-Interaktion aus verschiedenen Perspektiven modelliert mit der PyMOL-Software. Das TraO<sub>CT</sub> ist blau dargestellt. TraN ist dargestellt als Stäbchenmodell mit gelben Kohlenstoffatomen, blauen Stickstoffatomen und roten Sauerstoffatomen.

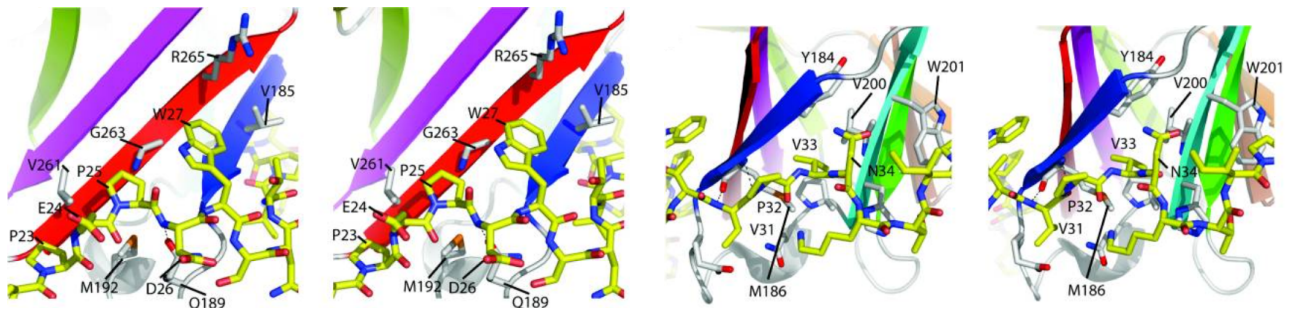


Abbildung 4: Strukturmodelle der beschriebenen TraO<sub>CT</sub>/TraN-Interaktion aus verschiedenen Perspektiven [104]. TraN ist dargestellt als Stäbchenmodell mit gelben Kohlenstoffatomen, blauen Stickstoffatomen und roten Sauerstoffatomen. Die  $\beta$ -Faltblätter des TraO<sub>CT</sub> sind unterschiedlich farbig hervorgehoben. Die interagierenden Aminosäuren sind markiert.



---

### 1.3 Zielstellung

---

Durch den wachsenden Einsatz hochreiner rekombinanter Proteine in Forschung und Therapie und das Interesse an Interaktionsstudien am lebenden Organismus hat die Produktion, Separation und Identifikation von Makromolekülen deutlich an Bedeutung gewonnen. Die einfachsten dieser biologischen Faktoren können in gentechnisch veränderten Organismen exprimiert und unkompliziert isoliert werden. Mit erhöhter Komplexität der Moleküle steigt oft die Anforderung an das Expressionssystem und die folgende Aufreinigungsprozedur. Durch die Fusion mit einer Auswahl unterschiedlicher Peptide oder Proteine können dem Zielproteinen einerseits zwar zweckdienliche Eigenschaften verliehen werden, andererseits haben diese meist einen negativen Effekt während einer anderen Phase des Produktionsprozesses. Da für einige sehr interessante und kommerziell verwertbare Produkte bisher keine Präparationsprotokolle erstellt werden konnten, sollte eine neue, möglichst spezifische, effektive, übertragbare, flexible und kostengünstige Methode zur Markierung und Isolierung von Makromolekülen etabliert werden. Die Wechselwirkung des TraO-Proteins mit dem TraN-Peptid wurde bisher ausschließlich im Zusammenhang mit dem Aufbau des Typ 4 Sekretionssystems beschrieben und gilt als einzigartig und besonders affin. Bei der Entwicklung einer neuartigen Methode zur Proteinmarkierung mussten zunächst die Interaktion und die ihr zugrunde liegenden, biospezifischen Partner TraO und TraN analysiert, sowie gleichzeitig anwendungsspezifische Optimierungen vorgenommen, werden. Die rekombinante Herstellung der verwendeten Derivate und ihre Charakterisierung hatten dabei Priorität. Diese bildeten eine Grundlage für den Einsatz des TraO/TraN-Tag-System in diversen Applikation. Neben der Herstellung biologisch aktiver Zytokine sollte die Möglichkeit eines Gebrauchs in weiteren biotechnologisch und biochemisch relevanten Anwendungen untersucht werden. Mit dieser Arbeit sollte die Basis für ein Proteinlabel geschaffen werden, welches möglichst viele positive Eigenschaften vereinigt und flexible Anwendungsmöglichkeiten bietet.

---

## 2 Material und Methoden

---

### 2.1 Material

---

#### 2.1.1 Bakterienstämme und Medien

---

Für Klonierungsarbeiten und zur Plasmidamplifikation wurde der *Escherichia coli* (*E.coli*)-Stamm Top10 (Novagen) verwendet. Die Expression rekombinanter Proteine erfolgte im *E.coli*-Stamm BL21(DE3) von New England Biolabs (NEB). Für die Kultivierung von allen Bakterienstämmen wurde LB-Vollmedium (1,0 % Trypton 0,5 % Hefeextrakt 1,0 % NaCl in aq. dest. pH 7,5) verwendet. Für die Herstellung von Agar-Platten wurde dem LB-Medium 1,5 % Agar zugefügt. Alle Medien wurden vor Verwendung bei 121 °C für 20 min autoklaviert. Für Selektivmedien wurde dem LB-Medium bzw. der noch warmen LB-Agar-Lösung 100 µg/ml Ampicillin zugegeben.

#### 2.1.2 Eukaryotische Zellen und Medien

---

Für die Herstellung von löslicher Rezeptoren und die Oberflächenexpression von Proteinen wurden adherent wachsende, humane embryonale Nierenzellen (human embryonic kidney), die das SV40 large T-Antigen exprimieren (HEK293T-Zellen, GE Healthcare) verwendet. Die Kultivierung erfolgte in 90 % DMEM, welchem 10 % FKS und 0,1 g/l Gentamycin zugesetzt wurden (DFG-Medium). Für den Reprotergenassay wurden Ba/F3-Zellen verwendet, die Kultivierung erfolgte in 90 % RPMI 1640, welchem 10 % FKS, 0,1 g/l Gentamycin (RFG-Medium) sowie 10 ng/ml mIL-3 zugesetzt wurde.

#### 2.1.3 Plasmide

---

Basisvektor für die Klonierung und Expression von Rezeptoren war das Konstrukt pcDNA3.1 (Invitrogen). Die rekombinante Expression von Zytokinen erfolgte in dem Expressionskonstrukt pRSET-5b (Invitrogen). Die Klonierung von Reportergenkonstrukten erfolgte mit dem Basisvektor pGL4.26-luc (Firma Promega). Die Plasmide peGFP-N1, mTFP-N1 und pKM101 wurden von der Universität Jena, Institut für Biachemie 2 zur Verfügung gestellt. Die Plasmidkarten für diese Vektoren sind in Plasmide (Anhang, Seite 122), in den Abbildungen 52- 56 aufgeführt.

#### 2.1.4 Primer

---

Die für die Klonierungen verwendeten Oligonukleotide (Primer) sind in den Tabellen 13 und 14 (Anhang, Kapitel 6.3, Seite 125 und 126) dargestellt. Alle Primer wurden von der Firma Eurofins MWG Operon bezogen. Die Sequenz der Primer ist immer in 5'-3'-Richtung angegeben, unterstrichen sind die Erkennungsstellen für Restriktionsenzyme. Abkürzungen: rev - reverse-Primer, fwd - forward-Primer. Die GenBank-Zugangsnummern der Referenzsequenzen für das Primerdesign sind in Tabelle 17 (Anhang, Seite 129) dargestellt.

#### 2.1.5 Restriktionsendonukleasen

---

Als Restriktionsendonukleasen wurden diverse Fast Digest-Enzyme (Thermo Fisher Scientific) durchgeführt, diese sind in Tabelle 15 (Anhang, Seite 127) dargestellt.

---

### 2.1.6 Antikörper

---

Die in dieser Arbeit eingesetzten Primär- und Sekundärantikörper sind:

- ⇒ rabbit-anti-mouse-FITC (Immunotools GmbH)
- ⇒ anti-P5D4-mAb (Institut für Biochemie 2, FSU Jena)

---

### 2.1.7 Zytokine

---

Die in dieser Arbeit eingesetzten Zytokine sind:

- ⇒ hTSLP (interne Produktion, Invigate GmbH)
- ⇒ mM-CSF (interne Produktion, Invigate GmbH)
- ⇒ hTNF- $\alpha$  (interne Produktion, Invigate GmbH)

---

### 2.1.8 TraN-Peptid

---

Das zur Elution verwendete TraN-Peptid wurde an der TU Darmstadt, AG Kolmar mit folgender Sequenz synthetisiert:

- ⇒ N-PEPDWSNTVPVNKTIP-C

---

### 2.1.9 Chemikalien / Feinchemikalien / Kits

---

3-(N-Morpholino)propansulfonsäure (MOPS)	Carl Roth GmbH & Co
5-Sulfosalicylsäure	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
6 × DNA Probenpuffer	Thermo Fisher Scientific
20 % SDS	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Affigel 10	Biorad
Agarose Seakam	Lonza
Agar Kobe I	Carl Roth GmbH & Co
Ampicillin-Natriumsalz	Carl Roth GmbH & Co.
Ammoniumperoxidsulfat (APS)	Carl Roth GmbH & Co.
Bacillol AF	BODE Chemie GmbH
$\beta$ -mercaptoethanol	Carl Roth GmbH & Co.
Bromophenolblau	Carl Roth GmbH & Co.
Calciumchlorid ( $\text{CaCl}_2$ )	Carl Roth GmbH & Co.
Cell Titer Glo <sup>®</sup>	Promega
Dialysierschläuche (MWCO 14 000 kDa)	Carl Roth GmbH & Co.
Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ )	Carl Roth GmbH & Co.
DMEM	Merck KGaA
DMSO	Carl Roth GmbH & Co.
DNA-Marker Generuler 1 kb Plus	Thermo Fisher Scientific

---

dNTPs	Thermo Fisher Scientific
DreamTaq Green Mastermix	Thermo Fisher Scientific
ECL-Kit	Perkin Elmer Life Sciences
$\epsilon$ -Aminocapronsäure	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Essigsäure	Carl Roth GmbH & Co.
Ethanol (reinst)	Carl Roth GmbH & Co.
Ethanolamin	Carl Roth GmbH & Co.
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Carl Roth GmbH & Co.
EZ-Link Plus Activated Peroxidase	Thermo Fisher Scientific
Faktor Xa-Protease	Qiagen
Ficoll Biocoll	Biochrom
FKS	PAA Laboratories GmbH
Gentamycin	Gibco BRL
GelRed	Biotium
Glycerin	Carl Roth GmbH & Co.
Glycin	Carl Roth GmbH & Co.
Größenstandard 1 kB Plus	Thermo Fisher Scientific
Guanidinhydrochlorid	Carl Roth GmbH & Co.
HiTrap NHS-Activated HP	GE Healthcare
Imidazol	Carl Roth GmbH & Co.
Injektionswasser	Braun
2-Propanol	Carl Roth GmbH & Co.
Kaliumacetat (KOAc)	Carl Roth GmbH & Co.
Kaliumchlorid (KCl)	Carl Roth GmbH & Co.
Kaliumhydroxid (KOH)	Carl Roth GmbH & Co.
L-Arginin	Carl Roth GmbH & Co.
L-Valin	Carl Roth GmbH & Co.
Lumi-Light ECL Substrate	Roche Diagnostics GmbH
Magnesiumchlorid-Hexahydrat ( $\text{MgCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$ )	Carl Roth GmbH & Co.
Mangan(II)-chlorid-Tetrahydrat ( $\text{MnCl}_2 \times 4 \text{H}_2\text{O}$ )	Carl Roth GmbH & Co.
Methanol	Carl Roth GmbH & Co.
Milchpulver	Carl Roth GmbH & Co.
Natriumacetat	Carl Roth GmbH & Co.
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth GmbH & Co.
Natriumdihydrogenphosphat-Dihydrat ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ )	Carl Roth GmbH & Co.
Natriumhydroxid (NaOH)	Carl Roth GmbH & Co.
Natriumsuccinat	Carl Roth GmbH & Co.
Nonidet P40 (NP-40)	Serva Electrophoresis GmbH

---

---

PageRuler™ Prestained Protein Ladder	Thermo Fisher Scientific
Pierce™ Unstained Protein MW Marker	Thermo Fisher Scientific
Phusion-Polymerase	Thermo Fisher Scientific
Ponceau S	Carl Roth GmbH & Co.
Restriktionenzyme Fast Digest®	Thermo Fisher Scientific
RNaseA	Carl Roth GmbH & Co.
Roti®-Mount FluorCare DAPI	Carl Roth GmbH & Co.
Rotiphorese®	Carl Roth GmbH & Co.
NF-Acrylamid/Bis-Lösung 40 % (29 : 1)	Carl Roth GmbH & Co.
RPMI 1640 w Glutamine	Sigma
Rubidiumchlorid (RbCl <sub>2</sub> )	Carl Roth GmbH & Co.
Salzsäure (HCl)	Carl Roth GmbH & Co.
Sepharose (Q- / CM-) Fastflow	GE Healthcare
Sterillium	BODE Chemie GmbH
T4-Ligase	Thermo Fisher Scientific
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Carl Roth GmbH & Co.
Trichloressigsäure (TCA)	Carl Roth GmbH & Co.
Tris	Carl Roth GmbH & Co.
Trypanblau	Merck KGaA
Trypsin-EDTA (1x)	Biochrom
Tween-20	Carl Roth GmbH & Co.

---

## 2.1.10 Geräte und Materialien

---

SDS-PAGE-Elektrophorese-Kammer	MINI-Vertikal Standard(Carl Roth GmbH)
Schüttelinkubator	CERTOMAT® IS (Sartorius)
Schüttelinkubator	CERTOMAT® BS-1 (Sartorius)
Homogenisator	Panda Plus (GEA Niro Soavi)
Sterilwerkbank	NUAIRE (IBS Integra Biosciences)
CO <sub>2</sub> -Inkubator	NUAIRE (IBS Integra Biosciences)
Pipettierhelfer	accu-jet® pro (Brand)
Mikroliter-Pipetten	Transferpette® S (Brand)
Tischzentrifuge	Centrifuge 5415R (Eppendorf)
Mikroskop	IT 400 (VWR)
Zählkammer	Neubauer improved
FACS Gerät	Cube8 (Partec)
Photometer	BIOPHOTOMETER (Eppendorf)
Zentrifuge	Rotina 420R (Hettich)
Tischwaage	TE412 (Satorius)
Feinwaage	CPA224S (Satorius)
Heizblock/Schüttler	TurboShaker 3 500i (scienova GmbH)
Freezer (−80 °C)	Sanyo
Freezer (−20 °C)	Liebherr
Kühlschrank	Liebherr
Semi-Dry-Blotter	PEGASUS (Phase)
Blaulichttisch/Geldokumentation	Gel LED Slider (Intas)
Agarosegelelektrophorese-Kammer	MIDI 1 (Roth GmbH )
Amaya-Nukleofektor I	AMAXA GmbH, jetzt LONZA
WB Detektor G-Box	Syngene (VWR)
PCR-Thermocycler	peqSTAR 96X Universal (Peqlab)
Chromatographie-Anlage	Äkta Avant (GE Healthcare)
pH-Meter	S220 SevenCompact (Mettler Toledo)
Vortex-2 Genie	Scientific Industries
Kulturgefäße	Greiner BioOne
Kulturflaschen für Suspensionskulturen	Greiner BioOne
6-, 12-, 96-Well-Platten	Greiner BioOne
Reaktionsgefäße, steril: 15 ml, 50 ml	Greiner BioOne
Reaktionsgefäße: 0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml	Carl Roth GmbH & Co.
Pipettenspitzen: 10 µl, 200 µl, 1000 µl	Greiner BioOne
Einwegpipetten: 5 ml, 10 ml	Greiner BioOne
Rollerflaschen	Greiner BioOne
Luminometer	GloMax® 96 Microplate Luminometer (Promega)
Fluoreszenzmikroskop	Apotome (Zeiss)
Plattenlesegerät	POLARstar Omega (BMG Labtech)

---

## 2.1.11 Puffer und Lösungen

---

### Allgemein

TE-Puffer:	50 mM Tris 1 mM EDTA mit HCl pH 8,0 einstellen bei 4 °C lagern
TAE-Puffer:	40 mM Tris 0,114 % Essigsäure 1 mM EDTA mit HCl pH 8,0 einstellen bei 4 °C lagern
NaPO pH 8,0-Puffer:	21,3 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ 2,5 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ bei 4 °C lagern
NaPO pH 6,0-Puffer:	5,6 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ 20,5 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ bei 4 °C lagern
PBS:	137 mM NaCl 2,7 mM KCl 8,1 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ 1,4 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4$ bei RT lagern
PBS-T:	137 mM NaCl 2,7 mM KCl 8,1 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ 1,4 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 0,05 % Tween-20 bei RT lagern
Standard-Rückfaltungs-Puffer :	50 mM Tris 1 mM EDTA 500 mM L-Arginin 0,4 mM Glutathion oxidiert

	2 mM Glutathion reduziert 1 mM EDTA mit HCl pH 8,0 einstellen bei RT lagern
Transfektionsreagenz V:	90 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ 90 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ 10 mM $\text{MgCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$ 5 mM KCl 10 mM Natriumsuccinat mit HCl/NaOH pH 7,2 einstellen bei 4 °C lagern, am besten frisch ansetzen
Faktor Xa-Puffer:	20 mM Tris 50 mM NaCl 1 mM $\text{CaCl}_2$ mit HCl pH 6,5 einstellen bei 4 °C lagern
Hitrap-Puffer A:	500 mM Ethanolamin 500 mM NaCl mit HCl pH 8,3 einstellen bei 4 °C lagern
Hitrap-Puffer B:	100 mM Natriumacetat 500 mM NaCl mit Essigsäure pH 4,0 einstellen bei 4 °C lagern
EZ-Link-Conjugation Buffer,	100 mM $\text{NaHCO}_3$ 0,9 % NaCl mit NaOH pH 9,5 einstellen bei 4 °C lagern

#### Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen

Tfb I:	30 mM KOAc 50 mM $\text{MnCl}_2 \times 4 \text{H}_2\text{O}$ 100 mM $\text{RbCl}_2$ 100 mM $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ 15 % Glycerin
--------	--



---

mit Essigsäure pH 5,8 einstellen, sterilfiltrieren  
bei  $-20^{\circ}\text{C}$  lagern

Tfb II:

10 mM MOPS  
75 mM  $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$   
10 mM  $\text{RbCl}_2$   
15 % Glycerin  
mit KOH pH 6,5 einstellen, sterilfiltrieren  
bei  $-20^{\circ}\text{C}$  lagern

### Isolierung von Plasmid-DNA durch alkalische Lyse und 2-Propanol-Fällung

Resuspensionspuffer P1:

50 mM Tris  
10 mM EDTA  
100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  RNaseA  
mit HCl pH 8,0 einstellen  
bei  $4^{\circ}\text{C}$  lagern

alkalischer Lysepuffer P2:

200 mM NaOH  
1 % SDS (w/v)  
bei RT lagern

Neutralisationspuffer P3:

3 M KOAc  
mit Essigsäure pH 5,5 einstellen  
bei RT lagern

### SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Trenngelpuffer (TGP):

2 M Tris  
mit HCl pH 8,0 einstellen  
bei  $4^{\circ}\text{C}$  lagern

Sammelgelpuffer (SGP):

2 M Tris  
mit HCl pH 8,0 einstellen  
bei  $4^{\circ}\text{C}$  lagern

5  $\times$  PPP (Proteinprobenpuffer):

250 mM Tris  
10 % SDS (w/v)  
30 % Glycerol  
5 %  $\beta$ -mercaptoethanol  
0,02 % Bromophenolblau

	mit HCl pH 6,8 einstellen bei 4 °C lagern
Trenngelpuffer (TGP):	2 M Tris mit HCl pH 8,0 einstellen bei RT lagern
Sammelgelpuffer (SGP):	2 M Tris mit HCl pH 6,8 einstellen bei RT lagern
Elektrodenpuffer:	25 mM Tris 192 mM Glycin 0,15 % SDS (w/v) bei RT lagern
Coomassie-Färbelösung:	45 ml Ethanol (vergällt) 45 ml H <sub>2</sub> O 10 ml Essigsäure 250 mg Coomassie R250 bei RT lagern
<u>Western-Blot</u>	
Kathodenpuffer:	25 mM Tris 40 mM $\epsilon$ -Aminocapronsäure 20 % Methanol bei RT lagern
Anodenpuffer:	300 mM Tris 20 % Methanol bei RT lagern
Ponceau-Rot:	0,260 mM Ponceau S 185 mM Trichloressigsäure (TCA) 11,8 mM Sulfosalicylsäure bei RT lagern
NET-G-Puffer:	50 mM Tris 150 mM NaCl 5 mM EDTA

	0,05 % Triton X-100 0,25 % Gelatine mit HCl pH 7,4 einstellen bei RT lagern
TBS-T-Puffer:	50 mM Tris 150 mM NaCl 0,05 % Tween 20 mit HCl pH 7,5 einstellen bei RT lagern
<u>IMAC-Puffer</u>	
IMAC-Puffer A:	25 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ 250 mM NaCl mit NaOH pH 8,0 einstellen bei 4 °C lagern
IMAC-Puffer B:	25 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ 250 mM NaCl 1 M Imidazol mit NaOH pH 8,0 einstellen bei 4 °C lagern
<u>Puffer zur Kopplung von Protein an eine Agarosematrix</u>	
Kopplungspuffer:	20 mM MOPS mit HCl pH 7,5 einstellen bei 4 °C lagern
Stopp-Puffer:	0,5 M Tris mit HCl pH 8,0 einstellen bei 4 °C lagern
<u>TraN-Elutionspuffer</u>	
Arginin / Valin-Puffer	0,5 M Arginin 0,5 M Valin  50 mM Tris 1 mM EDTA

	mit HCl pH 8,0 einstellen bei 4 °C lagern
Arginin / 2-Propanol-Puffer	0,5 M Arginin 20 % (v/v) 2-Propanol 50 mM Tris 1 mM EDTA mit HCl pH 8,0 einstellen bei 4 °C lagern
TraNshort-Peptid-Puffer	50 mM Tris 1 mM EDTA mit HCl pH 8,0 einstellen 1 mg/ml Peptid bei 4 °C lagern
Glycin-Puffer	50 mM Glycin mit HCl pH 2,0 einstellen bei 4 °C lagern
NaCl-Puffer	50 mM Tris 1 mM EDTA 500 mM NaCl mit HCl pH 8,0 einstellen bei 4 °C lagern
2-Propanol-Puffer	20 % (v/v) 2-Propanol 50 mM Tris 1 mM EDTA mit HCl pH 8,0 einstellen bei 4 °C lagern
Arginin / 5 % 2-Propanol-Puffer	0,5 M Arginin 5 % (v/v) 2-Propanol 50 mM Tris 1 mM EDTA mit HCl pH 8,0 einstellen bei 4 °C lagern
5 % 2-Propanol-Puffer	5 % (v/v) 2-Propanol 50 mM Tris

---

Arginin / Ethanol-Puffer

1 mM EDTA  
mit HCl pH 8,0 einstellen  
bei 4 °C lagern

0,5 M Arginin  
20 % (v/v) Ethanol  
50 mM Tris  
1 mM EDTA  
mit HCl pH 8,0 einstellen  
bei 4 °C lagern

---

## 2.2 Mikrobiologische Methoden

---

### 2.2.1 Kultivierung von Bakterien

---

Die *E. coli*-Kulturen wurden unter ausreichender Belüftung bei 37 °C in LB-Vollmedium angezogen. Bestand eine Plasmid-vermittelte Ampicillinresistenz, so wurden die Medien mit Ampicillin in einer Endkonzentration von 100 µg/ml supplimentiert. Die Inkubation erfolgte jeweils unter Schütteln bei 180 rpm. Beimpft wurden die Medien durch Übertragung von Einzelkolonien von Nährbodenplatten oder von Aliquots entsprechender Vorkulturen. Für eine Vorkultur wurden 3 ml LB-Ampicillin-Medium im Reagenzglas mit einer Bakterienkolonie beimpft und bei 37 °C über Nacht (ü. N.) schüttelnd inkubiert.

### 2.2.2 Bestimmung der Zelldichte von Bakterienkulturen

---

Die Zelldichte der Bakterienkulturen wurde durch das Messen der optischen Dichte (OD<sub>600</sub>) bei einer Wellenlänge von 600 nm im Photometer bestimmt. Dazu wurden die Kulturen bis zu einer maximalen Zelldichte OD<sub>600</sub> = 1 entsprechend mit LB-Vollmedium verdünnt.

### 2.2.3 Herstellung chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen

---

Chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen wurden mittels Rubidiumchlorid hergestellt [105]. Ein 200 ml-Kolben mit 50 ml LB-Vollmedium wurde mit 100 µl einer *E. coli* Vorkultur inokuliert, welche am Tag zuvor angesetzt wurde (5 ml-Vorkultur). Die Bakterienkultur wurde bei 37 °C und 180 rpm bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,4 bis 0,5 angezogen. Anschließend wurde die Kultur auf 50 ml-Reaktionsgefäße aufgeteilt und 10 min auf Eis inkubiert. In dieser Zeit wurde die Zentrifuge vorgekühlt und die Kulturen anschließend für 10 min bei 4 °C und 4 700 × g zentrifugiert. Die Pellets wurden in je 6,25 ml eiskaltem Tfb I vorsichtig aufgenommen, vereinigt und 30 min auf Eis inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation (4 °C, 10 min, 4 700 × g) wurden die Pellets in 3 ml eiskaltem Tfb II vereinigt, in vorgekühlten 1,5 ml Tubes zu je 100 µl aliquotiert, eingefroren und bei –80 °C bis zur Verwendung gelagert.

### 2.2.4 Transformation von kompetenten *E. coli*-Zellen

---

Die Transformation von Plasmiden zum Zwecke ihrer Amplifikation erfolgte in chemokompetenten *E. coli*-Zellen. 100 µl Zellen wurden langsam auf Eis aufgetaut und 1 µg Plasmid-DNA oder 10 µl Ligationsansatz dazugegeben. Nach 20 minütiger Inkubation des Ansatzes auf Eis wurde dieser für 90 s einem Hitzeschock im 42 °C warmen Heizblock ausgesetzt. Nach weiteren 5 min auf Eis erfolgte die Zugabe von 500 µl LB-Medium und die Inkubation der Suspension für 45 min im Rotationsschüttler bei 37 °C, dabei wurde das auf dem Plasmid zur Selektion befindliche Resistenzgen exprimiert. Die Zellsuspension wurde im Anschluss 3 min bei 4 700 × g zentrifugiert, der Überstand entfernt und das Pellet in 10 µl LB-Medium resuspendiert. Danach wurde die Zellsuspension auf antibiotikahaltige LB-Agarplatten (100 µg/ml Ampicillin) ausgestrichen und bei 37 °C ü. N. inkubiert.

### 2.2.5 Herstellung rekombinanter Proteine in *E. coli*-Zellen

---

Zur Expression der Zielproteine in *E. coli* wurde der Stamm BL21(DE3) verwendet. Das in den Vektor pRSET-5b (2.1.3) eingebrachte Gen des Zielproteins steht unter der Kontrolle eines lac-Promotors,

---

der die gezielte Transkription eingefügter Sequenzen durch die Zugabe des Galaktoseanalogons Isopropylthiogalaktopyranosid (IPTG) erlaubt. IPTG ist ein nicht metabolisierbarer Induktor, der an den Repressor bindet und die Transkription der lac-Strukturgene und des eingeführten Inserts ermöglicht. Die Plasmide für die Expression prokaryontischer Gene wurden wie beschrieben (2.2.4) in die kompetenten Zellen transformiert. Am nächsten Morgen wurden Einzelkolonien von den Agarplatten angeimpft und deren Expression getestet. Ein positiver Klon wurde in 800 ml LB-Kolben überführt und bei 37 °C und 180 rpm schüttelnd inkubiert. Bei  $OD_{600} = 0,5$  wurde die Kultur mit 1 mM IPTG induziert. Nach 3 h wurde die Kultur in 600 ml Zentrifugenbecher umgefüllt und die Bakterien bei  $4\,700 \times g$  zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Bakterienpellet in 400 ml TE-Puffer resuspendiert und bei 1000 bar im Homogenisator aufgeschlossen. Bei der anschließenden 10 min Zentrifugation bei  $12\,000 \times g$  wurde die Suspension in Zellysat (ZL) und bakterielle Einschlusskörper (Inclusion Bodies, IB) getrennt. Sofern nötig wurde die Masse der IB bestimmt bzw. das ZL Zur Überprüfung der Expression und zur Lokalisation des Zielproteins wurden Proben in der SDS-PAGE analysiert. Für das ZL wurden nach der Homogenisierung 20 µl Überstand verwendet, für die IB-Analyse wurden 20 µl der rückgefalteten Proteinlösung aufgetrennt und für eine Analyse der Gesamtkultur wurde ein definierte Volumen der an Schüttelkultur bei  $16\,000 \times g$  abefugt und das Pellet in 20 µl H<sub>2</sub>O aufgenommen, mit 5 × PPP versetzt und in der SDS-PAGE aufgetrennt. Das Volumen errechnet sich nach folgender Formel:

$$V = 150 \mu\text{l} / OD_{600} \quad (1)$$

V = Volumen Schüttelkultur für eine SDS-PAGE-Probe

$OD_{600}$  = optische Dichte bei 600 nm

---

### 2.2.6 Rückfaltung rekombinanter Proteine aus Inclusion Bodies

---

In IB vorhandene Zielproteine wurden zunächst solubilisiert und denaturiert. Dafür wurde das chaotrope Reagenz Guanidinhydrochlorid verwendet [106] [107]. Ein Gramm IB wurden entsprechend in 20 ml 6 M Guanidinhydrochlorid gelöst. Die denaturierte Proteinlösung wurde durch Zugabe des 100-fachen Volumen eiskaltem Puffer (NaPO pH 6,0-Puffer bzw. Standard-Rückfaltungs-Puffer) verdünnt. Dadurch faltet sich das Protein spontan zurück. Nach 3 h wurden die Proben, falls nötig, dialysiert, ggf. anfallende Aggregate durch Zentrifugation ( $12\,000 \times g$ , 10 min) und Filtration (3 µm) abgetrennt und das Protein mittels Ionenaustauschchromatographie gereinigt.

---

## 2.3 Molekularbiologische Methoden

---



---

### 2.3.1 Isolierung von Plasmid-DNA durch alkalische Lyse und 2-Propanol-Fällung

---

Für die Isolierung von Plasmiden wurden die Zellen durch alkalische Lyse in Gegenwart von SDS aufgeschlossen [108]. Aus den transformierten, auf Agarplatten ausgesäten *E. coli* wurde je eine 2 ml-Einzelkolonien in einer 24-Well-Platte angesetzt. Nach ca. 6 h wurden 1,5 ml in ein Reaktionsgefäß über-

---

führt und bei  $16\,000 \times g$  zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und das Pellet in 150 µl Resuspensionspuffer P1 aufgenommen. Anschließend wurden 150 µl alkalischer Lysepuffer P2 zugegeben. Danach erfolgte die Zugabe von 150 µl Neutralisationspuffer P3, dabei fallen Lipide, Proteine und chromosomale DNA als unlöslicher Komplex aus. Aus dem Überstand der folgenden Zentrifugation bei  $16\,000 \times g$  kann die präzipitierte Plasmid-DNA durch Zugabe von 400 µl 2-Propanol gewonnen und durch erneute Zentrifugation bei  $16\,000 \times g$  isoliert werden. Das Sediment wurde anschließend zur Entfernung mitgefällter Salze in 70 %-igem Ethanol (v/v) gewaschen. Abschließend erfolgte die Trocknung der DNA-Pellets bei  $60^\circ\text{C}$  und die Aufnahme der DNA in aq. dest.

---

### 2.3.2 Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

---

Aufgrund von  $\pi$ -Elektronen der konjugierten Doppelbindungen in den Basen der Nukleinsäuren absorbieren DNA und RNA ultraviolettes Licht mit einer Maximalabsorption bei etwa 257 nm. Mit der UV-Absorptionsspektroskopie konnte die Nukleinsäurekonzentration einer Lösung und deren Reinheit bestimmt werden. Der Quotient der Absorption bei 260 und 280 nm kann als Maß für die Reinheit der Lösung herangezogen werden, da die aromatischen Aminosäuren der Proteine ein Absorptionsmaximum bei 280 nm haben. Für reine DNA-Lösungen erhält man Werte um 1,8 und für RNA-Lösungen um 2,0. Die Absorption (A) von monochromatischem Licht durch eine gelöste und genügend verdünnte Substanz wird durch das Lambert-Beersche Gesetz beschrieben:

$$A = \lg\left(\frac{I_0}{I}\right) = \varepsilon * c * d \quad (2)$$

$I_0$  = Intensität des eingestrahnten Lichtes

$I$  = Intensität des die Probe verlassenden Lichtstrahls

$\varepsilon$  = molarer Extinktionskoeffizient [ $\text{cm}^2/\text{mmol}$ ]

$c$  = Konzentration der Probe

$d$  = Schichtdicke der Probe

Als  $I_0$  wurde die nicht absorbierte Lichtintensität einer Referenzküvette in Wasser ohne die zu messende Probe genommen. Die Absorption bei 260 nm dient als Grundlage für die Konzentrationsberechnung, wobei für einzelsträngige DNA eine Absorptionseinheit bei 260 nm einer Konzentration von etwa 33 µg/ml entspricht. Für RNA beträgt dieser Wert etwa 40 µg/ml und für doppelsträngige DNA etwa 50 µg/ml.

---

### 2.3.3 Isolierung von RNA aus primären Zellen und Zelllinien

---

Die Isolierung von RNA aus primären Zellen oder Zelllinien wurde stets mit dem RNeasy Mini-Kit Plus der Firma Qiagen durchgeführt. Dazu wurden primäre Zellen oder Zelllinien auf 6-Well-Platten ausgesät, bei einer Zelldichte von ca.  $1 \times 10^6$  Zellen pro Well stimuliert und anschließend durch Zugabe von 350 µl Lysepuffer direkt in den Wells lysiert. Die Aufarbeitung der RNA erfolgte dann nach Herstellerprotokoll.



---

### 2.3.4 Synthese von cDNA

---

Die Synthese von cDNA erfolge grundsätzlich direkt nach der RNA-Isolierung, wobei alle verwendeten Komponenten von der Firma Thermo Fisher Scientific bezogen wurden. Das von empfohlene Protokoll wurde abgeändert und wie folgt angewendet:

Tabelle 1: RNA-Primer-Mischung

Komponenten	Volumen	Endkonzentration
RNA	je nach Konzentration	2 µg je Reaktionsansatz
Oligo(dT)18 Primer (100 µM)	0,5 µl	2,5 µM
Random-Hexamer Primer (100 µM)	0,5 µl	2,5 µM
ddH <sub>2</sub> O	ad 11 µl	

Der Ansatz wurde für 5 min bei 70 °C inkubiert, anschließend für 5 min auf Eis gekühlt und dann 9 µl Mastermix zugesetzt. Der Ansatz wurde 5 min bei RT, dann für 10 min bei 37 °C und anschließend für 60 min bei 42 °C inkubiert. Danach wurde der Ansatz zur Inaktivierung vorhandener DNAsen für 10 min bei 65 °C inkubiert, 1 µl der Probe als Kontrolle auf einem 1 % Agarosegel analysiert und die verbleibende Probe bei –20 °C gelagert.

Tabelle 2: Mastermix reverse Transkription

Komponenten	Volumen	Endkonzentration
Reverse Transkriptase Puffer (5×)	4 µl	1×
dNTPs (10 mM)	1 µl	0,5 mM
RiboLock RNase-Inhibitor (40 U / µl)	0,5 µl	20 U
Reverse Transkriptase H-Minus (200 U / µl)	0,5 µl	200 U
ddH <sub>2</sub> O	ad 9 µl	Gesamtvolumen 20 µl

---

### 2.3.5 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

---

Die Polymerase-Kettenreaktion(PCR) [109] [110] wird zur Amplifizierung von DNA-Fragmenten verwendet. Die präparative PCR wird zur Amplifikation und Klonierung von DNA-Fragmenten durchgeführt. Diese können anschließend in Plasmide oder andere DNA-Fragmente eingebaut werden. Durch spezifisches Primerdesign können die zu klonierenden Bereiche definiert werden und durch Einbringen von geeigneten Schnittstellen mit Plasmiden verknüpft werden (2.1.4). Aufgrund ihrer 50-fach höheren Genauigkeit bei der Replikation gegenüber der Taq-Polymerase wurde dafür ausschließlich die Phusion-II-Hot-Start-DNA-Polymerase der Firma Finnzymes bzw. Thermo Fisher Scientific verwendet. Die Verwendung erfolgte nach Herstellerprotokoll. Der PCR-Ansatz wurde wie in Tabelle 3 aufgelistet zusammengestellt. Zum Einbringen einer Mutation an einer bestimmten Stelle in der Proteinsequenz wurde die Basensequenz an der entsprechenden Stelle in der Plasmid-DNA so verändert, dass ein Aminosäure-Austausch erfolgt (site-directed-mutagenesis PCR). Am N-terminalen oder C-terminalen Ende der Basensequenz kann dieser einfach durch Änderung der Basen im verwendeten forward- (fwd) oder reverse-Primer (rev)

realisiert werden. Befindet sich die zu mutierende Region im mittleren Bereich der Sequenz, werden zusätzlich zu den forward- und reverse-Primern der Vollängenmatrize zwei weitere Primer benötigt. Diese besitzen die Sequenz der Zielsequenz und binden als forward-oder reverse-Primer im Bereich der Mutation. Es wurden zwei PCR durchgeführt. Im ersten Schritt, bei der die wildtypische DNA-Sequenz als Template verwendet wurde, wurden zwei PCR-Produkte amplifiziert, sie bestehen aus dem N-terminalen Bereich des Proteins bis zur eingebauten Mutation, bzw. aus dem C-terminalen Bereich des Proteins ab der Mutation. Beide Fragmente wurden aufgereinigt und im zweiten PCR-Schritt als Template unter Verwendung des forward- und reverse-Primers verknüpft. Es entstand die vollständige mutierte DNA-Sequenz als PCR-Produkt, welches über Restriktion in ein Plasmid eingebaut wurde. Zur Analyse von Klonierungsprodukten wurde der DreamTaq Master Mix (Thermo Fisher Scientific) verwendet. Diese Variante der PCR wird verwendet, um Bakterienklone dahingehend zu überprüfen, ob das aufgenommene Plasmid die gewünschte DNA-Sequenz durch Ligation erfolgreich eingebaut hat. Die einzelnen Bakterienkolonien wurden dazu zunächst von einer Agarplatte gepickt und in 24-Well-Platten in 2 ml LB-Medium mit Antibiotika für ca. 3 h bei 37 °C inkubiert. Als DNA-Matrize wurde 1 µl Bakterienkultur zugegeben. Als Positivkontrolle wurde cDNA oder DNA, welche das nachzuweisende Insert enthält, verwendet. Der PCR-Ansatz wurde wie in Tabelle 4 aufgelistet zusammengestellt. Alle PCR-Reaktionen wurden ähnlich dem in Tabelle 5 dargestellten Ablauf durchgeführt.

Tabelle 3: Standardansatz präparative PCR

PCR-Ansatz	Menge	Konzentration
DNA-Matrize	50 ng	1 ng/µl
Phusion-Polymerase	0,5 µl (2 U)	0,02 U/µl
dNTP's	1 µl (10 mM)	0,02 mM
Phusion-Buffer	10 µl (5 ×)	1 ×
Primer fwd	1 µl (10 µM)	0,2 µM
Primer rev	1 µl (10 µM)	0,2 µM
ddH <sub>2</sub> O	ad 50 µl	

Tabelle 4: Standardansatz Kolonie-PCR

PCR-Ansatz	Menge	Konzentration
DNA-Matrize	1 µl	
DreamTaq Master Mix	5 µl (2 ×)	1 ×
Primer fwd	0,2 µl (10 µM)	0,2 µM
Primer rev	0,2 µl (10 µM)	0,2 µM
ddH <sub>2</sub> O	ad 10 µl	

Tabelle 5: Standard PCR-Programm

PCR-Schritt	Temperatur	Dauer	Zyklen
Initiale Denaturierung	95 °C	5 min	1 ×
Denaturierung	95 °C	30 s	35 ×
Hybridisierung	variabel	30 s	
Elongation	72 °C	15 s/kb	
Finale Elongation	72 °C	5 min	1 ×
Pause	4 °C		

### 2.3.6 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Die endonukleolytische Spaltung von DNA (Verdau) wurde mit diversen Fast Digest-Enzymen (Thermo Fisher Scientific) durchgeführt. Es wurden die jeweils vom Hersteller empfohlenen Puffer- und Temperaturbedingungen gewählt. PCR-Fragmente wurden in der Agarosegelelektrophorese aufgetrennt (2.3.8) und anschließend mit dem GeneJET Gel Extraction and DNA Cleanup Micro Kit von Thermo Fisher Scientific aus dem Gel isoliert (2.3.9). Nach dem Verdau wurden die verdauten PCR-Fragmente erneut über das GeneJET Gel Extraction and DNA Cleanup Micro Kit gereinigt und verdaute Plasmide wurden in der Agarosegelelektrophorese aufgetrennt und isoliert. Die allgemeine Zusammensetzung eines Restriktionsverdaus sind in Tabelle 6 dargestellt.

Tabelle 6: Standard-Restriktionsverdau für PCR-Fragmente und Plasmid-DNA

	Menge	Menge	Konzentration
PCR-Fragment	600 ng		ng/20 µl
Plasmid-DNA		2 µg	100 ng/µl
Fast Digest Buffer	3 µl (10 ×)	3 µl (10 ×)	1 ×
Restriktionsenzym	1 µl	1 µl	
ddH <sub>2</sub> O	ad 30 µl	ad 30 µl	

---

### 2.3.7 Ligation von DNA-Fragmenten mit der T4 DNA-Ligase

---

Zur Ligation von kompatiblen DNA-Fragmenten wurde die T4-DNA Ligase (Thermo Fisher Scientific) verwendet. Sie katalysiert unter ATP-Verbrauch die Bildung einer Phosphodiesterbindung zwischen der 5'-Phosphat- und der 3'-Hydroxylgruppe und ermöglicht so die Verbindung von kompatiblen DNA-Enden. Der Reaktionsansatz ist in Tabelle 7 gezeigt. Die Insert-DNA wurde dabei in vierfach-molarem Überschuss eingesetzt. Die Ligation wurde über 20 min bei Raumtemperatur (RT) durchgeführt.

Tabelle 7: Ligationsansatz für die Ligation von DNA-Fragmenten mittels T4-Ligase

	Menge	Konzentration
Plasmid-DNA	100 ng	10 ng/µl
Insert-DNA	400 ng	40 ng/µl
T4 DNA Ligase Puffer	1 µl (10 ×)	1 ×
T4 DNA Ligase	0,5 µl (2 U/µl)	0,1 U/µl
ddH <sub>2</sub> O	ad 10 µl	

---

### 2.3.8 Agarosegelelektrophorese

---

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten erfolgte in einem 1 %igen (w/v) Agarosegel mit TAE-Laufpuffer. Es wurden die Seakam-Agarose (Lonza) und das MIDI 1 Elektrophorese-Kammer-System (Roth) verwendet. Die Auftrennung erfolgte im elektrischen Feld (100 V, 400 mA, 30 min), bei der sich negativ geladene DNA-Fragmente aufgrund ihrer unterschiedlichen Molekulargewichte mit verschiedenen Geschwindigkeiten in der Agarosematrix bewegen. Zur Größenabschätzung wurde der Größenstandard 1 kB Plus (Thermo Fisher Scientific) mit aufgetragen. Zur Visualisierung der Größenauftrennung wurde dem 6 × Probenpuffer 0,5 % (v/v) GelRed (Biotium) zugegeben. Die anschließende Detektion mittels Blaulicht LED Illumination (420 - 490 nm) erfolgte am Gel LED Slider (Intas).

---

### 2.3.9 Gelextraktion linearer DNA-Fragmente

---

Mit dem Gelextraktionskit GeneJET Gel Extraction and DNA Cleanup Micro Kit (Thermo Fisher Scientific) konnten gelelektrophoretisch aufgetrennte DNA-Fragmente verschiedener Größe aus einem Agarosegel isoliert werden. Die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben.

---

### 2.3.10 DNA-Sequenzierung

---

Die Sequenzierung von Plasmiden wurde durch die Eurofins Genomics GmbH durchgeführt. Die Plasmide wurden in wässriger Lösung nach Bedürfnissen des Anbieters verdünnt und versendet. Zur Auswertung der Sequenzen und zur Kartierung der Plasmide wurde der APE-Plasmid Editor genutzt.

---

## 2.4 Zellbiologische Methoden

---

---

### 2.4.1 Kultivierung und Konservierung eukaryontischer Zellen

---

Die verwendeten Zellen wurden in Zellkulturflaschen (25 cm<sup>2</sup>, 75 cm<sup>2</sup> oder Rollerflaschen je nach Bedarf an Zellen) im Kompletmedium steril kultiviert. Die Inkubation der Zellen erfolgte in einem

---

CO<sub>2</sub>-Begasungsbrutschrank für Zell- und Gewebekulturen (NUAIRE) bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und 90 % relativer Luftfeuchte. Die verwendeten Ba/F3-Zellen sind Suspensionszellen, die Kultivierung wurde in 90 % RPMI 1640, welchem 10 % FKS und 0,1 g/l Gentamycin (RFG-Medium) sowie 10 ng/ml murines Interleukin-3 (mIL-3) zugesetzt waren, vorgenommen. Bei einer Zelldichte von ca.  $1,5 - 2 \times 10^6$  Zellen/ml wurden sie unter Mediumwechsel auf eine Zelldichte von ca.  $1,5 - 2 \times 10^5$  Zellen/ml verdünnt. Bei einer Verdopplungszeit von etwa 20 - 24 h ist dies alle 3 - 4 Tage nötig. Bei HEK293T-Zellen handelt es sich um adhärenz wachsende Zellen, die Kultivierung erfolgte in 90 % DMEM, welchem 10 % FKS und 0,1 g/l Gentamycin (DFG-Medium) zugesetzt wurden. Die Zellen müssen vor dem Splitten durch kräftiges abklopfen oder Zugabe von Trypsin/EDTA (Biochrom) vom Flaschenboden abgelöst werden. Zum Abstoppen der Trypsin-Reaktion wurde in gleicher Menge Kulturmedium hinzu gegeben, das darin enthaltene FKS stoppt die Reaktion. Danach erfolgte die Verdünnung wie oben beschrieben. Um Zellen vom Medium zu trennen, wurden sie bei  $300 \times g$  für 5 min abzentrifugiert, anschließend in PBS resuspendiert (gewaschen) und erneut zentrifugiert. Danach konnten sie in frischem oder verändertem Medium aufgenommen werden.

---

#### 2.4.2 Inkulturnahme und Kryokonservierung von Zellen

---

Bei –80 °C konservierte Kulturen wurden im Wasserbad bei 37 °C aufgetaut, in entsprechendes Medium gegeben und schnellstmöglich durch Zentrifugation bei  $300 \times g$  für 5 min vom Einfriermedium getrennt. Nach mehreren Waschgängen mit ihrem Medium konnten die Zellen in Kulturflaschen aufgenommen werden. Um Kulturen einzufrieren und auf Dauer zu konservieren, wurden ca.  $2 \times 10^7$  Zellen/ml in Einfriermedium (90 % DMSO + 10 % FKS) aufgenommen. Die Suspension wurde zu je 1 ml auf sterile Kryoröhrchen verteilt und bei –80 °C eingefroren.

---

#### 2.4.3 Bestimmung der Vitalität und der Zellzahl mit Trypanblau

---

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte durch Ausschlussfärbung mit einer 4 %igen (w/v) Trypanblaulösung in einer Neubauer improved-Zählkammer. Mit dieser Methode lässt sich die Lebendzellzahl bestimmen. Das Zählgitter besteht aus Großquadraten von je 1 mm Kantenlänge und somit einer Fläche von je 1 mm<sup>2</sup> und einer Kammerhöhe von 0,1 mm. Ein Großquadrat entspricht der Zellzahl in 0,1 µl Lösung.

---

#### 2.4.4 Kultivierung und Transfektion von Ba/F3-Zellen

---

Diese Art der Transfektion beruht auf Elektroporation und ist ein von der Firma Amaxa GmbH (jetzt LONZA) entwickeltes Verfahren. Sie erfolgte im Nucleofector-Gerät (Amaxa GmbH). Die Einstellungen am Gerät und die Wahl des Mediums können für die jeweilige Zelllinie optimiert werden, wodurch hohe Transfektionseffizienzen bei hoher Zellvitalität erzielt werden können. In Vorversuchen wurde mit Ba/F3-Zellen die beste Transfektionseffizienz mit dem Transfektionsreagenz V als Medium und dem Programm T16 erreicht. Für jeden geplanten Transfektionsansatz wurden  $5 - 6 \times 10^7$  Zellen bei  $300 \times g$  für 5 min abzentrifugiert und diese nach zwei Waschgängen mit PBS in 100 µl Transfektionsreagenz V aufgenommen. Nach Zugabe von 1 µg des Stat1-responsiven Reportergenkonstruktes (pGL4.26-IRF1-luc) und je 1 µg der beiden Hybridkonstrukte (pcDNA3.1-cFMSEX/hTSLP-rint und pcDNA3.1-cFMSEX/hIL-7Raint) (2.1.3)[111] wurden die Ansätze auf die vom Hersteller (AMAXA GmbH) bereitgestellten Elektroporationsküvetten verteilt. Es erfolgte die Transfektion in diesen Küvetten mit dem oben genannten

---

Programm. Die transfizierten Zellen wurden in die benötigte Menge RFG-Medium gegeben. In einer 96-Well-Rundbodenplatte wurden pro Well  $1 \times 10^6$  dieser Zellen in je 100  $\mu$ l Medium ausgesät.

---

#### 2.4.5 Einfacher Luciferasereporteragenassay mit Ba/F3-Zellen

---

Im Luciferasereporteragenassay wird die Zytokin-induzierte Hochregulierung der Luciferaseexpression anhand der verwendeten Reporteragenkonstrukte ermittelt. Für die Nachweisreaktion des gebildeten Enzyms wurde das Luciferase Assay System der Firma Promega genutzt. Für den Luciferase-Assay wurden die Zellen mit einem Stat1-spezifischen Reporteragenkonstrukt und den genannten Hybridrezeptorkonstrukten (2.4.4) transfiziert und stimuliert. Ba/F3-Zellen wurden zunächst für ca. 7 h in mIL-3-freiem RFG-Medium starviert. Für Reporteragenversuche wurden die Zellen zu  $1 \times 10^6$  Zellen/Well in je 100  $\mu$ l RFG-Medium in 96-Well-Rundbodenplatten als Dreifachbestimmung ausgesät und stimuliert, die anschließende Inkubationszeit betrug ca. 16 h. Die Zellen wurden pelletiert ( $300 \times g$ , 5 min) und das Pellet in 50  $\mu$ l Lysepuffer für 15 min lysiert. Dann erfolgte die Zugabe von 50  $\mu$ l Luciferase-Substrat und die Messung im Luminometer. Die Messung und Injektion der Substrate erfolgte am Glomax Luminometer (Promega). Die Zytokinbindung an den extrazellulär präsentierten Rezeptorketten führte zur intrazellulären Stat1-Phosphorylierung [111]. Da gleichzeitig ein P-Stat1-responsives Reporteragenkonstrukt transfiziert wurde, kommt es in Abhängigkeit der Zytokinkonzentration und Aktivität zur Expression von Luciferase, welche das vorliegende Luciferin in Oxyluciferin umwandelt, wodurch detektierbare Lumineszenz entsteht. Die Intensität der Lumineszenz (LU) ist proportional zur gebildeten Luciferasemenge [112] und somit ein Maß für die Zytokinaktivität. Aus dem Verhältnis der resultierenden Lumineszenz von stimulierten zu unstimulierten Zellen konnte der Stimulationsindex (SI) gebildet werden.

---

#### 2.4.6 Transfektion und Kultivierung von HEK293T-Zellen

---

Die Transfektion der HEK293T-Zellen wurde in Multiwell-Platten durchgeführt. Bei Ansätzen für die Mikroskopie wurde vor Beginn der Kultivierung ein Deckglas in ein Well einer 24-Well-Platte gelegt. Es wurden  $3 \times 10^5$  Zellen /  $\text{cm}^2$  ausgesät und über Nacht in 0,25  $\text{ml}/\text{cm}^2$  DFG-Medium kultiviert. In einem 1,5  $\text{ml}$ -Reaktionsgefäß wurden pro  $\text{cm}^2$  Kulturfläche in 20  $\mu$ l serumfreiem Medium 0,4  $\mu$ g Plamid DNA gemischt. Dazu wurde anschließend 0,4  $\mu$ l Turbofect (Thermo Fisher Scientific) gegeben, erneut gemischt und 20 min inkubiert. Der Ansatz wurde vorsichtig einem Well zugegeben. Anschließend wurden die Zellen wieder ü. N. kultiviert.

---

#### 2.4.7 Nachweis der P5D4-Oberflächenexpression auf HEK-Zellen

---

HEK293T-Zellen wurden in einer 6-Well-Platte ausgesät und mit den Plasmiden transfiziert. Einen Tag nach der Transfektion der HEK293T-Zellen mit den Plasmiden zur Oberflächenexpression wurde das Medium von den Zellen entfernt. Die Zellen wurden mit 1  $\text{ml}$  PBS vorsichtig abgespült und in 1,5  $\text{ml}$ -Reaktionsgefäße überführt. Diese wurden anschließend bei  $300 \times g$  für 5 min zentrifugiert, die Überstände entfernt, in 100  $\mu$ l PBS resuspendiert und die Lebendzellzahl bestimmt (2.4.3). Für den Versuch wurden die unterschiedlich transfizierten Zellen danach in 1,5  $\text{ml}$ -Reaktionsgefäße mit je 30 000 Zellen in 50  $\mu$ l PBS verteilt. Der Versuch wurde bei RT durchgeführt, als Kontrolle wurden untransfizierte Zellen mitgeführt. Den unterschiedlich transfizierten Proben wurde zum einen 10  $\text{pmol}$  chromatographisch aufgereinigtes TraO-TFP-TraO zugegeben. Zum anderen wurde parallel 5  $\mu$ l des geklärten, nicht chromatographisch gereinigten TraO-TFP-TraO-ZL zugegeben. Alle Proben wurden für 1 h bei 20 rpm auf

---

---

dem Drehrad inkubiert. Als Expressionskontrolle wurde pro Ansatz mit 7 pmol des primären P5D4-Antikörpers (anti-P5D4-mAb) für 30 min bei 20 rpm auf dem Drehrad inkubiert, eine Kontrolle ohne primären P5D4-Antikörper wurde mitgeführt. Den Ansätzen wurde anschließend 1 ml PBS zugegeben, bei  $300 \times g$  abzentrifugiert und der Überstand bis auf 50  $\mu$ l entfernt. Anschließend wurde den resuspendierten Zellen sekundärer, FITC-konjugierter Antikörper (1 : 100, rabbit-anti-mouse-FITC, Immunotools GmbH) zugegeben und die Reaktion erneut für 30 min bei 20 rpm auf dem Drehrad inkubiert. Allen Ansätzen wurde anschließend 1 ml PBS zugegeben, bei  $300 \times g$  abzentrifugiert und der Überstand bis auf 50  $\mu$ l entfernt. Nach erneuter Resuspension in 1 ml PBS wurde die Zellsuspension in das Durchflusszytometer überführt.

---

#### 2.4.8 Stabile Transfektion von Rezeptorketten in HEK293T-Zellen

---

Einige Zeit nach der Transfektion von Plasmiden (2.4.6) ist die Expression der dadurch eingebrachten Gene in der Regel nicht mehr nachweisbar. Das transfizierte Plasmid wird nicht mit repliziert, teilende Zellen geben das Plasmid nicht an die weiter Tochterzellen und es wird als Fremd-DNA in der Zellen abgebaut. Um eine dauerhafte Expression zu erreichen werden exprimierende Zellen selektioniert. Dies geschieht durch dauerhafte Kultivierung der Zellen nach Transfektion (2.4.1) unter Zugabe des Selektionsmarkers Zeomycin (150  $\mu$ g/ml). Gegen dieses Antibiotikum sind die Zellen resistent, wenn z. B. das Plasmid pcDNA3.1 eingebaut wird, über welches die genetische Information für die Resistenz vermittelt wird. HEK293T-Zellen wurden mit diesen Expressionskonstrukten transfiziert und über mehrere Wochen kultiviert. Dabei überlebten die Zellen, welche die Plasmid-DNA stabil in ihr Genom integrieren konnten.

---

#### 2.4.9 Fluoreszenzmikroskopie

---

Nach der Transfektion der HEK293T-Zellen auf Deckgläser, wurden diese in der 24-Well-Platte gewaschen, fixiert und inkubiert. Zunächst wurde das Medium entfernt und die Zellen mit 1 ml eiskaltem PBS gewaschen. Dieses wurde sofort wieder entfernt und die Zellen erneut mit 1 ml eiskaltem PBS gewaschen und 5 min auf Eis inkubiert. Nach Entfernung des PBS wurde zur Fixierung der Zellen 200  $\mu$ l eiskaltes Methanol zugegeben und die Platte bei  $-20^\circ\text{C}$  für 20 min inkubiert. Anschließend wurden die Zellen noch drei mal bei RT mit je 1 ml PBS gewaschen. Den einzelnen Wells wurde anschließend 5  $\mu$ l des nicht chromatographisch gereinigtem TraO-TFP-TraO-ZL in je 1 ml PBS zugegeben und auf dem Schüttler bei RT für 20 min inkubiert. Anschließend wurde noch zwei Mal mit PBS gewaschen und der Überstand erneut gründlich entfernt. Auf einem Objektträger wurden 5  $\mu$ l Roti<sup>®</sup>-Mount FluorCare DAPI gegeben und das Deckglas vorsichtig kopfüber auf die Flüssigkeit gegeben, angedrückt und bei RT im Dunkeln getrocknet. Am darauf folgenden Tag wurden am Institut für Biochemie 2 der FSU-Jena fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen mit einer Vergrößerung von  $40 \times$  für DAPI und TFP erstellt.

---

#### 2.4.10 Durchflusszytometrie

---

Oberflächenpräsentierte Proteine können auf Zellen oder Festkörpern (Beads) unter Verwendung spezifischer Sonden oder Antikörpern (z. B. Rezeptoren) sichtbar gemacht werden. Bei der Durchflusszytometrie werden Zellen (bzw. Beads) durch eine Kapillare in das Durchflusszytometer gesaugt, so dass diese hintereinander und einzeln an einem Laserstrahl vorbei gleiten. Das auftreffende Licht wird dabei in unterschiedliche Richtungen abgelenkt. Vorwärts gestreutes Licht (Forward Scatter, FSC) gibt Auskunft

über die relative Größe, seitwärts gestreutes Licht (Side Scatter, SSC) ist ein Maß für die Oberflächenbeschaffenheit bzw. Granularität des Analyten. Verschiedene Fluoreszenzkanäle können die Bindung von fluoreszenzmarkierten Partikeln erfassen. Für einen Nachweis wurden mindestens  $2 \cdot 10^5$  Zellen abzentrifugiert, mit PBS gewaschen und inkubiert. Zur Analyse im Zytometer (Cube 8, Partec) wurden die Zellen in 1 ml PBS aufgenommen. Die Detektion erfolgte anschließend nach Standardprotokoll im Fluoreszenzkanal 1 (FL1, Anregung bei 488 nm) für FITC, GFP und TFP. Untransfizierte Zellen wurden jeweils gleich behandelt und als Negativkontrolle verwendet. Die Daten wurden im Density plot (aufgetragen FSC gegen SSC oder FSC gegen FL-1) oder Histogramm (aufgetragen FL-1 gegen Anzahl) ausgewertet. Die Fluoreszenz wird sichtbar durch die Verschiebung der Signale auf der entsprechenden Fluoreszenzsignal-Achse.

## 2.5 Proteinbiochemische Methoden

### 2.5.1 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Die Analyse von Proteinen erfolgte mit einer Abwandlung der denaturierenden, diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE), in welcher Proteine nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt werden [113] [114]. Sodium Dodecyl Sulfat (SDS) wurde als anionisches Detergenz verwendet, um die Proteine zu denaturieren und negativ zu beladen. Zur Untersuchung von Molekülen wurden 17,5 %ige (v/v) Polyacrylamid-Gele selbst hergestellt. Eine Anleitung befindet sich in Tabelle 8. Es wurde das von Roth erhältliche MINI-Vertikal Doppel-Elektrophorese-Kammer-System verwendet und zuvor vorbereitete Proteinproben mit geeigneten Volumina PPP ( $5 \times$ ) versetzt und 5 min bei  $95^\circ\text{C}$  inkubiert. Die Kammern wurden mit Elektrodenpuffer befüllt und die Geltaschen mit einer Proteinprobe beladen. Die Auftrennung der Proteine erfolgte für 90 min bei 300 V/25 mA. Anschließend können die Proteine mit Coomassie-Färbelösung angefärbt werden oder für Antikörper-Nachweise durch Western Blotting auf Nitrocellulose-Membranen übertragen werden (2.5.3). Die theoretischen Molekulargewichte aller rekombinant hergestellten Proteine sind im Anhang (Proteineigenschaften) in Tabelle 16 aufgelistet.

Tabelle 8: SDS-PAGE Standardansatz für zwei 17,5 %ige SDS-PAGE-Gele

Komponente	Trenngel	Sammelgel
H <sub>2</sub> O	2,25 ml	2,15 ml
Trenn-/Sammelgelpuffer	3 ml	1,25 ml
Acrylamid (40 %)	3,3 ml	0,55 ml
Glycerin (75 %)	1,5 ml	0,5 ml
SDS (20 %)	75 µl	25 µl
APS (10 %)	75 µl	40 µl
TEMED	15 µl	10 µl

### 2.5.2 Coomassie-Färbung von Polyacrylamidgelen

Die Proteine wurden im Polyacrylamidgel durch Färbung sichtbar gemacht [115]. Zu diesem Zweck wurde das Gel unter ständigem Schwenken mit Coomassie-Färbelösung (2.1.11) für 20 min inkubiert.



---

Zum Entfärben des Gels schloss sich eine 20 bis 60-minütige Inkubation mit heißem Wasser an. In dieser Zeit wurde das Gel immer wieder aufgekocht und das Wasser gewechselt bis der Hintergrund komplett entfärbt war. Für Dokumentationszwecke wurde das Gel im Gel LED Slider (Intas) gescannt und archiviert.

---

### 2.5.3 Western Blot-Proteintransfer

---

Western Blot bezeichnet die Übertragung (engl. blotting) von Proteinen auf eine Trägermembran in einem senkrecht zum Polyacrylamid-Gel gerichteten elektrischen Feld [116]. Der Transfer von Proteinen aus SDS-Polyacrylamid-Gelen erfolgte auf eine Polyvinylidenfluorid-(PVDF-)Membran [117] (GE-Healthcare) in Richtung der Anode. Die PVDF-Membranen mussten vor dem Transfer in Methanol aktiviert werden. PVDF-Membranen sind hydrophober als die alternativ verwendeten Nitrozellulosemembranen und sowohl mechanisch als auch chemisch stabiler. Sie haben allerdings den Nachteil, dass sie, im Gegensatz zu Nitrozellulose, selbst kleine Mengen an Protein nicht vollständig binden. Zum Transfer wurde das Semi-Dry-Blotter PEGASU (Phase) verwendet. Der Blotvorgang dauerte bei 45 V und 1000 mA je nach Größe der Zielproteine 45-60 min. Nach dem Blotten wurde die Membran 15 min in Ponceau-Rot geschwenkt. Durch die auftretende Färbung konnte optisch kontrolliert werden, ob der Transfer erfolgreich war und überall die gleiche Proteinmenge aufgetragen wurde. Anschließend wurde der Blot mit aq. dest. entfärbt. Für die Detektion der Derivate im Western Blot wurde in der SDS-PAGE je 1 µg Protein aufgetragen.

---

### 2.5.4 Immunodetektion

---

Nach dem Blotten wurde die Membran für 60 min bei RT mit NET-G-Puffer geblockt und anschließend mit TBS-T Puffer 2 mal 5 min auf dem Schüttler gewaschen. Im Anschluss erfolgte die Inkubation mit Peroxidase-gekoppeltem TraO (1:5000 in 10 ml TBS-T) für 1 h bei RT. Durch 5 × 10 min waschen mit TBS-T sollte nicht gebundenes Peroxidase-Konjugat von der Membran entfernt werden. Zur Detektion wurde die Membran mit 1 ml ECL-Lösung (VWR) beträufelt und im Detektionsgerät (VWR) je nach Signalstärke 1 bis 15 min entwickelt und abgelichtet.

---

### 2.5.5 Ionenaustauschchromatographie

---

Die Ionenaustauschchromatographie gehört zu den physikalisch-chemischen Trennverfahren, die auf der Verteilung eines Substanzgemisches zwischen einer mobilen und einer stationären Phase beruhen. Die Ionenaustauschchromatographie ist eine Flüssigkeitschromatographie und wird für die Trennung von Anionen und Kationen herangezogen. Die stationäre Phase besteht aus einer polymeren Matrix mit reaktiven Gruppen, welche für die Trennung von Anionen ein quartäre Amine (Q-Sepharose/GE Healthcare) und für die Trennung von Kationen eine Carboxymethylgruppen (CM-Sepharose/GE Healthcare) sind. Unterscheiden sich der isoelektrische Punkt (pI) des Zielproteins und der pH-Wert der Lösung, in welcher es vorliegt, so ist das Protein geladen und bindet an die entsprechende Matrix. Die Chromatographie wurde mit einer Äkta Avant (GE Healthcare) durchgeführt. Zunächst wurde die Säule mit 10 Säulenvolumen (SV) des jeweiligen Beladungsspuffers equilibriert. Nach der Beladung der Säule mit dem Zellextrakt folgte ein Waschschriff mit 10 SV Beladungsspuffer. Die Elution erfolgte durch einen linearen Gradienten über 5 SV mit 0,5 M NaCl im Beladungsspuffer und anschließendem Stufengradienten über 2 SV mit 1 M NaCl im Beladungsspuffer. Abschließend wurde die Säule mit 5 SV 1 M NaOH

---

---

gereinigt, mit 10 SV aq. dest. gespült und in 20 % Ethanol bis zur weiteren Verwendung im Kühlschrank gelagert. Die Fraktionen wurden in einer SDS-PAGE (2.5.1) analysiert. War für deren weitere Verwendung ein Pufferwechsel notwendig, wurden die Proteinlösungen im Anschluss gegen mindestens das 100-fache des entsprechenden Puffers dialysiert. Die Dialyse erfolgte über Nacht bei 4 °C.

---

#### 2.5.6 Größenausschlusschromatographie

---

Die Größenausschlusschromatographie (size exclusion chromatographie; SEC), die häufig auch als Gel-permeationschromatographie bezeichnet wird, stellt eine weitere Form der Flüssigkeitschromatographie dar und wurde erstmals in den fünfziger Jahren beschrieben. Dabei werden die gelösten Moleküle durch poröse Gele nicht auf Grund von Wechselwirkungen mit dem Säulenmaterial, sondern gemäß ihres hydrodynamischen Volumens getrennt [118] [119]. Der Trennprozess beruht auf der Verteilung der gelösten Moleküle in einem Lösungsmittel. Die stationäre und die mobile Phase unterscheiden sich in der Bewegungsfähigkeit und nicht im chemischen Aufbau. Die zur Verfügung stehenden Poren der Polymermatrix besitzen unterschiedliche Durchmesser [120]. Daher verlassen große Moleküle die Säule zuerst, kleine eluieren später, da diese tiefer in das poröse Material eindringen. Zur Einstellung von Parametern wurde das Handbuch von GE Healthcare herangezogen. Die Chromatographie wurde mit einer Äkta Avant (GE Healthcare) durchgeführt und als Material Superdex 75 in einer 60 cm Trennstrecke (Durchmesser 16 mm) verwendet. Die Säule wurde zunächst mit 5 SV IMAC-Puffer A equilibriert. Die Proben wurden in IMAC-Puffer A dialysiert und mit einer Konzentration von 4 mg/ml je 500 µl über eine Probenschleife aufgetragen. Bei einer Flussrate von 1 ml/min wurden die Chromatogramme aufgenommen. Die Auswertung erfolgte mit der dazugehörigen Evaluationssoftware von Unicorn 6 (GE Healthcare). Dazu wurde 'Correlated Baseline' gewählt und die Integrale und Retentionvolumina  $V_e$  der Peaks errechnet.

---

#### 2.5.7 Immobilisierte Metallionen Affinitätschromatographie (IMAC)

---

Die IMAC ist ein physikalisch-chemisches Trennverfahren, bei dem die Affinität zwischen Polyhistidin und an die stationäre Phase kovalent gebundener Metallchelate genutzt wird. Die Proteine aus *E. coli*-Zellextrakten bzw. Mediumüberständen wurden zunächst über Nacht bei 4 °C in IMAC-Puffer A dialysiert. Als Matrix für die IMAC wurde Ni-NTA Agarose (Qiagen) verwendet. Die Chromatographiesäulen wurden nach Angaben des Herstellers mit einem Bettvolumen von 1 ml gepackt. Die Chromatographie wurde mit einer Äkta Avant (GE Healthcare) durchgeführt. Zunächst wurde die Säule mit 10 SV IMAC-Puffer A equilibriert. Nach der Beladung der Säule mit dem Zellextrakt bzw. dem Mediumüberstand folgte ein Waschschriff mit 10 SV IMAC-Puffer A (mit 10 mM Imidazol). Die Elution erfolgte als Stufengradient mit jeweils 6 SV mit 20, 50, 100, 250, 500 und 1000 mM Imidazol in IMAC-Puffer A. Abschließend wurde die Säule mit IMAC-Puffer A regeneriert und in 20 % (v/v) Ethanol bis zur weiteren Verwendung im Kühlschrank gelagert. Die Fraktionen wurden in einer SDS-PAGE (2.5.1) analysiert. War für deren weitere Verwendung ein Pufferwechsel notwendig, wurden die Proteinlösungen im Anschluss gegen mindestens das 100-fache des entsprechenden Puffers dialysiert. Die Dialyse erfolgte über Nacht bei 4 °C.

---

#### 2.5.8 Photometrische Bestimmung des Proteingehaltes

---

Die Quantifizierung der aufgereinigten und dialysierten Proteinproben erfolgte durch Messung ihrer Eigenabsorption. Durch den Gehalt an aromatischen Aminosäuren Phenylalanin, Tyrosin und Tryptophan

---

---

besitzen sie eine Absorption im UV-Bereich (280 nm). Die Absorption wird durch das Lambert-Beersche Gesetz beschrieben (2.3.2). Der molare Extinktionskoeffizient  $\varepsilon$  wird anhand der Proteinsequenz mit ProtParam (<http://web.expasy.org/protparam/>) bestimmt. Eine Übersicht der molaren Extinktionskoeffizienten aller aufgereinigten Proteine befindet sich im Anhang (Proteineigenschaften) in Tabelle 16.

---

#### 2.5.9 Spaltung von Protein mit Faktor Xa

---

Je 100  $\mu\text{g}$  Protein (1 mg/ml) wurden ü. N. bei 4 °C gegen 1 l Faktor Xa-Puffer dialysiert. Anschließend wurden je 10  $\mu\text{g}$  (0,3 nmol) der Proteine mit verschiedenen Mengen Faktor Xa (0,125- 1 U) bei RT für 3 h inkubiert. Nach Zugabe von 5  $\times$  PPP können die Proben in der SDS-PAGE analysiert werden.

---

#### 2.5.10 Bestimmung der Proteinmenge auf SDS-PAGE-Gelen

---

Die Proteinbanden in einem SDS-PAGE-Gel können nach dem Scannen des Gels quantifiziert werden. Um die Banden und ihre Intensität zu erfassen (Densitometrie), gibt es eine Vielzahl von graphischen Auswertungsprogrammen. Das verwendete Programm GelAnalyser ist kostenlos verfügbar. Dem gescannten SDS-PAGE-Gel wurden manuell die einzelnen Spuren zugeordnet. Anschließend konnten in den Spuren die Banden platziert werden. Die Intensität der Banden wurde nach Abzug der Hintergrundintensität ausgegeben.

---

#### 2.5.11 Kopplung von Proteinen an NHS-aktivierte Hitrap-Matrix

---

Die Kopplung von Proteinen an Beads erfolgte durch Verwendung der kommerziell erhältlichen HiTrap NHS-Activated HP-Matrix (GE Healthcare). Es handelt sich um ein Agarosegel mit N-Hydroxysuccinimid-Estern (NHS-Ester). NHS-Ester sind aktivierte Carbonsäuren und reagieren mit den Aminen der Proteine. Die Matrix wurde unter Ausschluss von Sauerstoff aus den kommerziell erhältlichen 1 ml-Chromatographiesäulen entfernt und in 2-Propanol bis zum jeweiligen Versuch gelagert. Die zur Kopplung verwendeten Proteine wurden in IMAC-Puffer A aufgenommen oder über Nacht gegen das 100-fache Volumen IMAC-Puffer A dialysiert. Anschließend wurde pro  $\mu\text{l}$  Matrix 0,1 nmol Protein in einem Volumen von 50  $\mu\text{l}$  bei 4 °C in einem 1,5 ml-Reaktionsgefäß inkubiert. Nach 2 h auf dem Drehrad bei 20 rpm wurde die Matrix mit 1 ml Hitrap-Puffer A gewaschen, bei 500  $\times$  g zentrifugiert und der Überstand entfernt. Die Prozedur wurde mit Hitrap-Puffer B wiederholt und erneut 1 ml Hitrap-Puffer A zugegeben und ü. N. bei 4 °C auf dem Drehrad bei 20 rpm inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation wurde der Überstand entfernt und noch einmal mit IMAC-Puffer A gewaschen, der Überstand nach Zentrifugation entfernt und die Matrix verwendet. Die Matrix kann mit einer mittleren Größe von 34  $\mu\text{m}$  in einem Durchflusszytometer analysiert werden (2.4.10).

---

#### 2.5.12 Nachweis immobilisierter Zytokine auf Hitrap-Matrix

---

Für jede Messprobe wurde jeweils 1  $\mu\text{l}$  Hitrap-Matrix verwendet und mit Protein gekoppelt (2.5.11). Die gekoppelten Beads wurden mit je 0,1 nmol mc-FMSR-HIS-TraNshortNC-T21A bzw. hTSLPRA-HIS-TraNshortNC-T21A in insgesamt 50  $\mu\text{l}$  IMAC-Puffer A bei 4 °C inkubiert. Nach 20 min auf dem Drehrad bei 20 rpm wurde mit 1 ml IMAC-Puffer A gewaschen und nach Zentrifugation bei 500  $\times$  g der Überstand entfernt, 0,2 nmol TraO-TFP-TraO zugegeben und erneut auf dem Drehrad inkubiert. Auch

---

die mit den löslichen Rezeptoren gekoppelten Beads wurden mit 0,2 nmol TraO-TFP-TraO inkubiert. 20 min später folgte ein Waschschriff mit IMAC-Puffer A und die Suspension der Matrix in 1 ml IMAC-Puffer A, in welchem die Probe in das Durchflusszytometer überführt wurde. Die BSA-Probe wurde lediglich in IMAC-Puffer A suspendiert und im Zytometer analysiert, sie dient als Negativkontrolle und zum Einstellen von FCS, SSC und des Messbereiches (Gate, 2.4.10). In diesem Gate wurden für 3000 Ereignisse (Beads) die Fluoreszenzen für FL1 gemessen und im Histogramm verglichen.

---

#### 2.5.13 TraO-Kopplungsversuche an immobilisiertes TraN-Fusionsprotein

---

Die im Rahmen der Arbeit erzeugten TraN-Fusionsproteine wurden mehrheitlich mit einem doppelten 6-fachem His-Tag ausgestattet, über den die Proteine an eine Ni-NTA Matrix (Ni-NTA Agarose, Qiagen) immobilisiert werden konnten. Dies ermöglicht die Isolierung von TraO aus der Flüssigphase über die Assoziation mit den auf der Agarose-Matrix gebundenen TraN-Segmenten (Pull-Down). Der Vorteil dieser Methode besteht darin, dass beide Interaktionspartner gemeinsam von der Matrix eluiert werden können und so zur Untersuchung der Bindeverhältnisse bzw. für die weitere Verfolgung technologischer Ansätze zur Verfügung stehen. Die Kopplungsexperimente wurden im kleineren Maßstab zwischen 100 µl und 1 ml in 1,5 ml-Reaktionsgefäßen durchgeführt (nähere Angaben zu den versuchsspezifischen Parametern siehe Tabelle 9). Nach 30-minütiger Inkubation der Ni-NTA-Beads mit den TraN-Fusionsproteinen bei RT wurden diese 5 min bei  $500 \times g$  abzentrifugiert und 5 min in IMAC-Puffer A (mit 10 mM Imidazol) gewaschen. Auf der erneut abzentrifugierten Matrix erfolgten die Inkubation mit den TraO bzw. TraO-Fusionsproteinen und zwei weitere Wasch-Schritte mit IMAC-Puffer A (mit 10 mM Imidazol). Die auf der Matrix gebundenen TraO und TraN-Proteine wurde schließlich mit IMAC-Puffer B eluiert.

Tabelle 9: Übersicht zu TraO-Kopplungsversuchen an Ni-NTA-Agarose

Experiment	Vol. Ni- NTA	TraN-HIS- Protein	TraO- Protein	Menge (Reak.- Vol.)	Wasch- Vol.	Elutions- Vol.
TraO-Pull- Down (3.2.1)	3 $\mu$ l	TraNfull- TEV-GFP- HIS	TraO- 126, TraO- SQE	0,2 nmol TraN; 0,02- 0,4 nmol TraO (100 $\mu$ l)	1 ml	30 $\mu$ l
TraO-Pull- Down (3.2.2)	3 $\mu$ l	TraNfull, TraNshortN, TraNshortC, TraNs- hortNC, TraNshortNC- W12A, TraNshortNC- V18A, TraNshortNC- T21A; (alle mit -TEV- GFP-HIS)	TraO- SQE	0,2 nmol TraN; 1 nmol TraO 30 $\mu$ l(100 $\mu$ l)	1 ml	30 $\mu$ l
TraN- Rezeptor- Pull-Down (3.4.1)	3 $\mu$ l	mc-FMSR- HIS- TraNshortNC- T21A	TraO- TFP- TraO (TraO- SQE)	0,1 nmol mc-FMSR- ; 0,1 nmol mM-CSF; 5 $\mu$ l TraO- TFP- TraO-ZL	1 ml	30 $\mu$ l
TraN- Rezeptor- Pull-Down (3.4.1)	3 $\mu$ l	hTSLPRa- HIS- TraNshortNC- T21A	TraO- TFP- TraO (TraO- SQE)	0,2 nmol hTSLPRa- ; 0,2 nmol hTSLP; 5 $\mu$ l TraO- TFP- TraO-ZL	1 ml	30 $\mu$ l

---

#### 2.5.14 Anreicherung von TraN-Fusionsproteinen über TraO-Agarose-Beads

---

Der umgekehrte experimentelle Aufbau zu Kap. 2.5.13 beinhaltet die kovalente Konjugation von TraO an eine NHS-aktivierte Agarosematrix (Affigel 10, Bio-Rad) sowie die anschließende Isolierung von TraN-Fusionsproteinen aus der Flüssigphase. Dieser Ansatz zielt auf eine affinitätschromatographische Reinigung von Proteinen mit angefügten TraN-Peptidsegmenten ab. Hierfür sollte das TraO-Protein im Elutionsschritt auf der Matrix verbleiben. Die aktivierte Agarosematrix wurde in Kopplungspuffer überführt und mit 10 µg TraO/µl Beadvolumen über 4 h abgedunkelt bei 4 °C inkubiert. Das TraO-Protein wurde hierzu in einer Konzentration von 6 mg/ml im Kopplungspuffer vorgelegt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1/10 vol. Stopp-Puffer und Inkubation über 30 min bei RT abgestoppt und die Beads bei 500 × g über 5 min abzentrifugiert. Bis zu ihrer Anwendung wurde die erzeugte TraO-Agarosematrix in NaPO pH 8,0-Puffer bei 4 °C gelagert. Die Anreicherungsexperimente mit verschiedenen TraN-Fusionsproteinen erfolgten im batch-Ansatz mit 3 µl - 500 µl TraO-Matrix (nähere Angaben zu den versuchsspezifischen Parametern siehe Tabelle 10). Um Affigel-Matrix in der SDS-PAGE zu analysieren, wurde der Überstand vollständig von den Beads entfernt, 20 µl PBS und 5 × PPP zugegeben und der Überstand nach 5 min Inkubation bei 95 °C aufgetragen. Die Inkubation mit Zielprotein und die Elution der Matrix erfolgten jeweils über 1 h bei RT.

Tabelle 10: Übersicht zu Anreicherung von TraN-Fusionsproteinen an TraO-Agarosematrix

Experiment	Vol. TraO- Matrix	TraO- Protein	TraN-Protein	Menge (Reak.- Vol.)	Wasch- Vol.	Elutions- Vol.
Bindeverhalten der TraN- Derivate (3.2.3; 3.3.2)	10 µl	TraO-SQE	TraNfull, TraNshortN, TraNshortC, TraNshortNC, TraNshortNC, TraNshortNC- V18A, TraNshortNC- T21A, TraNfull- T21A; (alle mit -TEV-GFP- HIS)	0,3 nmol, 10 µg, (200 µl)	1 ml	200 µl
TraN-FP Aufreini- gung aus ZL (3.3.1)	3 µl	TraO-SQE	TraNfull-TEV- GFP-HIS ( <i>E.coli</i> -ZL)	ZL (100 µl)	1 ml	-
Bindekapazität der TraO- Matrix (3.3.3)	10 µl	TraO-SQE	TraNfull-GFP- HIS	5 bis 100 µg, (0,15 bis 3 nmol), (200 µl)	1 ml	200 µl
Aufreinigung von TraN- Zytokin- Fusionsprotein (3.3.6)	100 µl	TraO-SQE	TraNfull- FX-hM-CSF, TraNfull- FX-hG-CSF, TraNfull- FX-hFGF-9, TraNfull-FX- hTNF	(5 ml)	15 ml	500 µl

---

### 2.5.15 Messung der Fluoreszenzintensität in wässriger Lösung

---

Die Messung der Fluoreszenzintensität wurde am POLARstar Omega (BMG Labtech), einem Plattenlesegerät für verschiedene Parameter, durchgeführt. In eine transparente 96-Well-Platte wurden 100 µl in ein Well pipettiert. Bei den gemessenen Fluoreszenzintensitäten handelt sich um relative Fluoreszenzeinheiten die unter einander verglichen wurden. Als Referenz diente PBS-T.

---

### 2.5.16 Erzeugung von TraO/HRP-Konjugaten

---

Zur Kopplung von TraO-SQE an Meerrettichperoxidase (Horseradish peroxydase, HRP) wurde das EZ-Link Plus Activated Peroxidase (Thermo Fisher Scientific) verwendet und nach Herstellerangaben verfahren. Es wurden 200 µl TraO-SQE (200 mg/ml mit 1 mg Peroxidase gekoppelt und zur Detektion des Western Blot verwendet.

---

## 2.6 Statistik

---

Die Fehlerbalken in den Diagrammen stellen den Standardfehler des arithmetischen Mittels dar. Dieser wird in Excel mit Hilfe der Formel "STABW.N" wie folgt berechnet:

$$\sigma(\bar{X}) = \frac{\sqrt{\frac{\sum(x-\bar{x})^2}{n}}}{\sqrt{n}} \quad (3)$$

x = Messwert

$\bar{x}$  = Stichprobenmittelwert

n = Stichprobenumfang



---

## 3 Ergebnisse

---

---

### 3.1 Herstellung der TraO/TraN Bindedomänen und Entwicklung optimierter Derivate für die biotechnologische Anwendung

---

---

#### 3.1.1 Klonierung, Expression und Aufreinigung von TraO

---

Die TraO-Sequenz (AS 170- 294) wurde per PCR aus dem Plasmid pKM101 amplifiziert und in das Expressionsplasmid pRSET-5b eingebracht. Das resultierende Plasmid pRSET-TraO-126 wurde in BL21(DE3)-Zellen transformiert und die Expression des traO-Gens durch IPTG über 3 h bei 37 °C induziert. Die Induktion lieferte eine Proteinbande im erwarteten Größenbereich (14,2 kDa), mit dem erzeugten Expressionsplasmid lässt sich ein hohes Expressionslevel erreichen. Die geerntete Biomasse aus 800 ml Schüttelkultur (2,5 g) wurde homogenisiert, die lösliche Fraktion des Zelllysats (ZL) von den Einschlusskörpern (Inclusion Bodies, IB) getrennt und auf einem SDS-Gel analysiert (Abbildung 5).

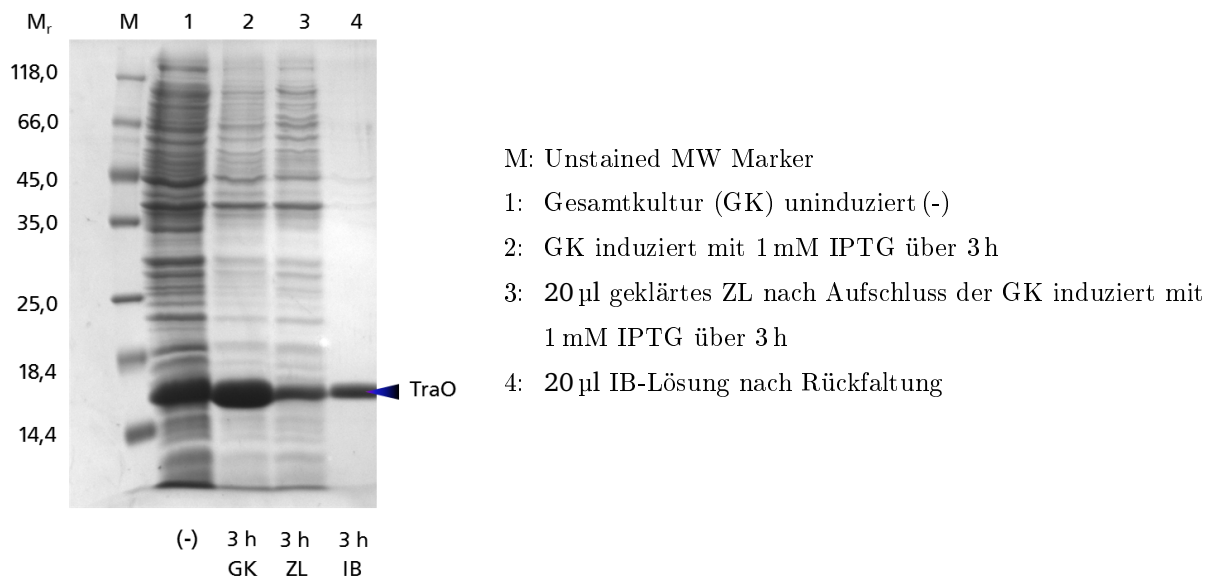


Abbildung 5: SDS-PAGE der Induktion und Lokalisation des Zielproteins TraO-126 mit anschließender Coomassie-Färbung. pRSET-TraO-126 transformiert in *E. coli* BL21(DE3).

Das größtenteils in den IB vorhandene Zielprotein wurde zunächst solubilisiert, denaturiert, in NaPO pH 6,0-Puffer zurückgefaltet und mittels Ionenaustauschchromatographie gereinigt. Der pI des TraO-126 liegt um etwa eineinhalb pH-Stufen höher als der pH-Wert des Beladungspuffers (NaPO pH 6,0-Puffer), somit bindet dieses an den CM-Kationentauscher und eluiert bei NaCl-Zugabe (Abbildung 6).

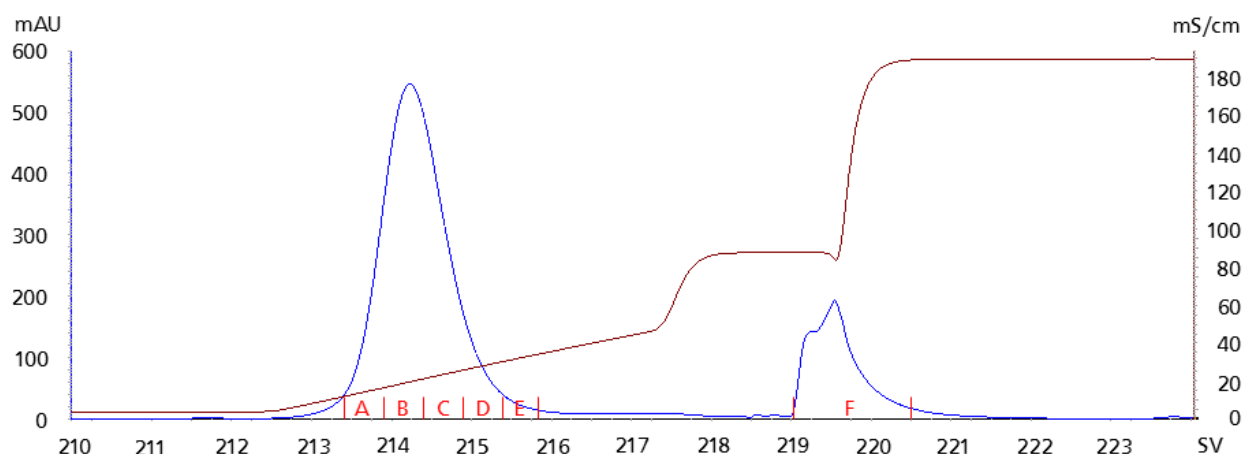


Abbildung 6: Chromatogramm der Aufreinigung von TraO-126 (nur die Elution) in einem CM-Kationentauscher, mit der Aufzeichnung der UV-Absorption bei 280 nm in mAU (blau), der Leitfähigkeit in mS/cm (braun) und den Fraktionen (rot)

Die Analyse im SDS-Gel zeigt die erfolgreiche Reinigung des Zielproteins (Abbildung 7). Die Fraktionen wurden vereinigt, gegen PBS dialysiert und die Gesamtproteinmenge photometrisch bestimmt. Aus 0,5 g IB konnten so 25 mg (1,7  $\mu$ mol) sauberes TraO-126 gewonnen werden.

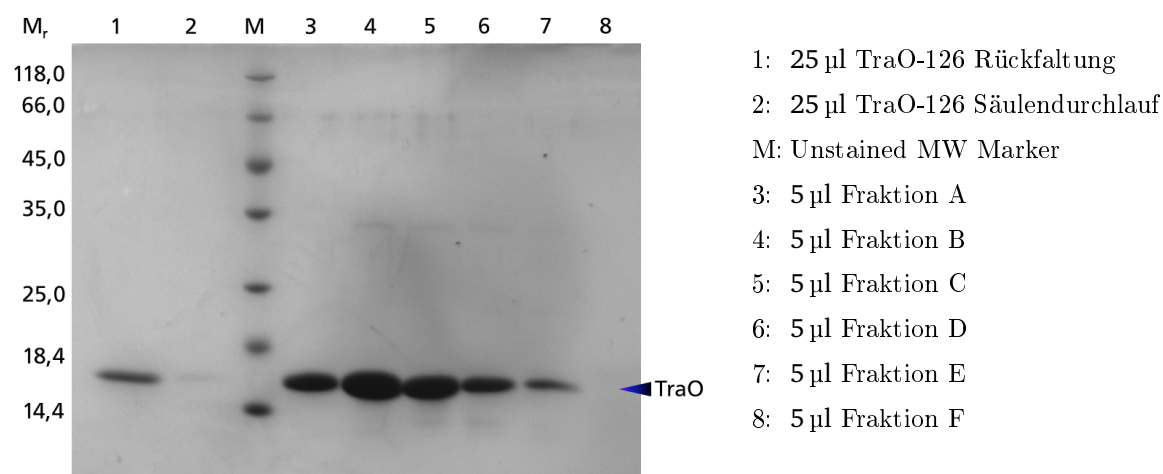


Abbildung 7: SDS-PAGE der chromatographischen Aufreinigung von TraO-126 mit anschließender Coomassie-Färbung.

### 3.1.2 Klonierung, Expression und Aufreinigung von TraN-Fusionsprotein aus *E. coli*

Um die spezifische Interaktion zwischen TraO und TraN nachzuweisen zu können, wurde an TraN (AS 17-48) C-terminal das grün fluoreszierende Protein (GFP) fusioniert. Durch PCR wurde mit entsprechenden Primern der für GFP kodierenden cDNA am 5'-Ende die wildtypische Sequenz für TraN (TraNfull) sowie eine Linkersequenz, eine Restriktionsschnittstelle und eine TEV-Protease-Spaltstelle angefügt. Am 3'-Ende wurde die GFP-Sequenz um einen doppelten His-Tag ergänzt, welcher zur Aufreinigung dient. Als Matrizenstrang wurde das Plasmid pEGFP verwendet. Das resultierende Fusionsprotein ist in Abbildung 8 dargestellt.



Abbildung 8: Schematischer Aufbau des Fusionsproteins TraNfull-TEV-GFP-HIS, welches in das pRSET-5b-Plasmid kloniert wurde.

Das PCR-Produkt wurde anschließend in das Plasmid pRSET-5b kloniert. Das resultierende Plasmid pRSET-TraNfull-TEV-GFP-HIS wurde in *E. coli* BL21(DE3) transformiert und die Bildung des TraNfull-TEV-GFP-HIS-Fusionsproteins (TraNfull-GFP) durch Zugabe von 1 mM IPTG über 3 h bei 37°C induziert. Die Induktion liefert eine Proteinbande im erwarteten Größenbereich (33,4 kDa), mit dem erzeugten Expressionsplasmid lässt sich ein mäßiges Expressionslevel erreichen. Die geerntete Biomasse aus 800 ml Schüttelkultur (3,2 g) wurde in 400 ml IMAC-Puffer A resuspendiert und homogenisiert. Die lösliche Fraktion des Zelllysats zeigt durch grünliche Färbung, dass sich das Zielprotein in dieser befindet. Anfallende Aggregate wurden durch Zentrifugation ( $12\,000 \times g$ , 10 min) und Filtration (3 µm) abgetrennt und das Protein mittels IMAC gereinigt (Bettvolumen 5 ml, Chromatogramm in Abbildung 9).

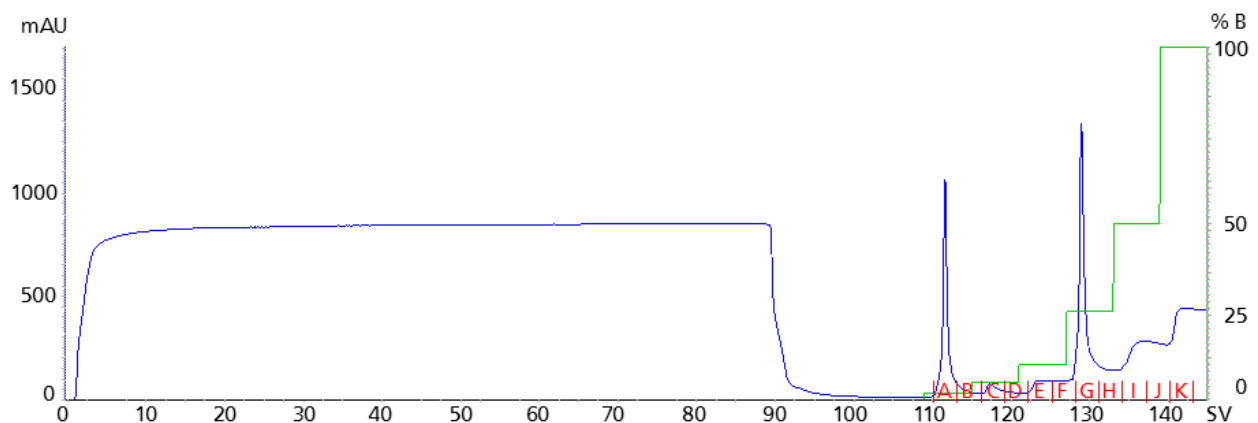


Abbildung 9: Chromatogramm der TraNfull-GFP Aufreinigung in der IMAC. Gesamtes Chromatogramm mit der UV-Absorption bei 280 nm in mAU (blau), Konzentration IMAC-Puffer B (grün) und den Fraktionen (rot)

Die Fraktion G (250 mM Imidazol) beinhaltet das Zielprotein in hoher Reinheit (> 95 %) und wurde, gemeinsam mit den anderen Proben aus dem Herstellungsprozess, in der SDS-PAGE analysiert (Abbildung 10).

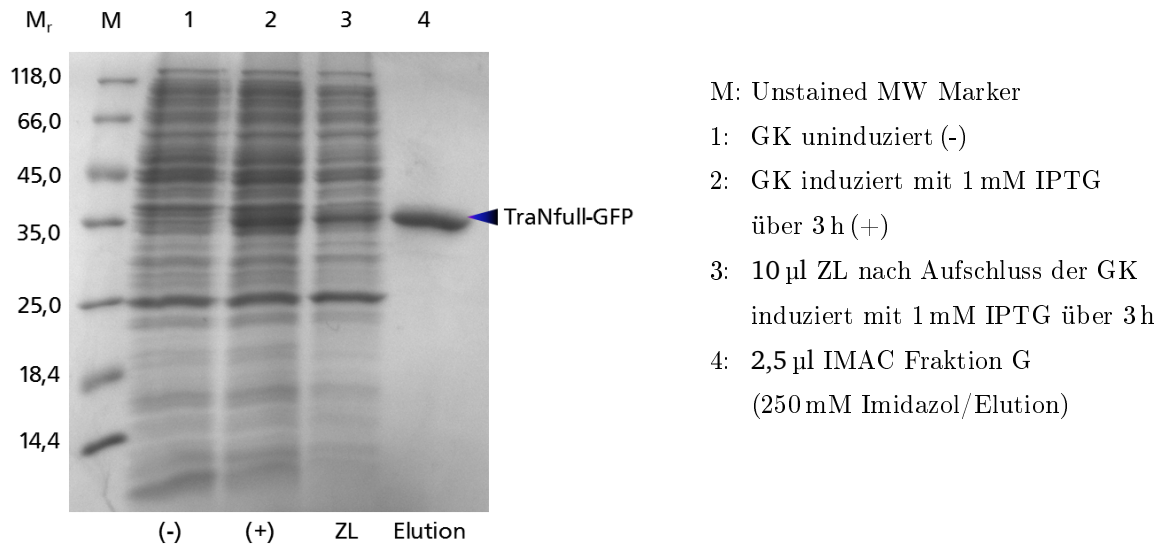


Abbildung 10: SDS-PAGE der Induktion und Aufreinigung des Zielproteins TraNfull-GFP in *E. coli* BL21(DE3) transformiert mit pRSET-TraNfull-TEV-GFP-HIS mit anschließender Coomassie-Färbung.

Die Fraktion wurde gegen IMAC-Puffer A dialysiert und die Proteinkonzentration bestimmt. So konnten aus 800 ml Schüttelkultur etwa 21,4 mg (640 nmol) TraNfull-GFP hergestellt werden.

### 3.1.3 Modifizierung des TraO-Moleküls zur Verringerung der Selbstassoziation

Es besteht die Möglichkeit, dass zwei einzelne TraO-Moleküle miteinander in Wechselwirkung treten. Wie beschrieben (1.2.1), ordnen sich mehrere TraO-Moleküle ringförmig in der äußeren Membran des Bakteriums an. Derartige Interaktionen können sich negativ auf die eigentlich zu untersuchende Interaktion zwischen TraO und TraN auswirken. Aus diesem Grund wurden zwei alternative TraO-Varianten erstellt (Abbildung 11). Die Variante TraO-SQE enthält drei Aminosäure-Austausche im Bereich der TraO-TraO-Interaktion (G272S, A275Q, A277E). Die Nomenklatur bezieht sich auf die Sequenz des Gesamtproteins. Die zweite TraO-Variante wurde mit C-terminal verkürzter Sequenz kloniert (TraOshort). Ihr fehlt der Aminosäurebereich 268 - 294 (100 - 126). In Abbildung 11 sind die Veränderungen in den Aminosäuresequenzen dargestellt und in Abbildung 12 sind die TraO-Veränderungen anhand zweier TraO-Molekülmodelle dargestellt.

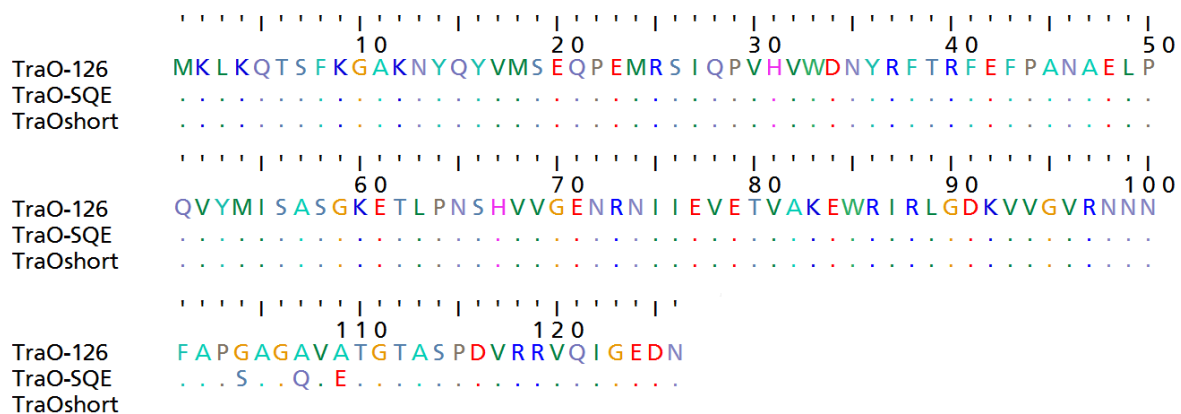


Abbildung 11: Aminosäuresequenzen der verschiedenen TraO-Varianten. Aminosäureposition 2 entspricht Position 170 des TraO-Gesamtproteins. Für TraO-SQE und TraOshort sind die abweichenden Aminosäuren hervorgehoben bzw. deletiert.

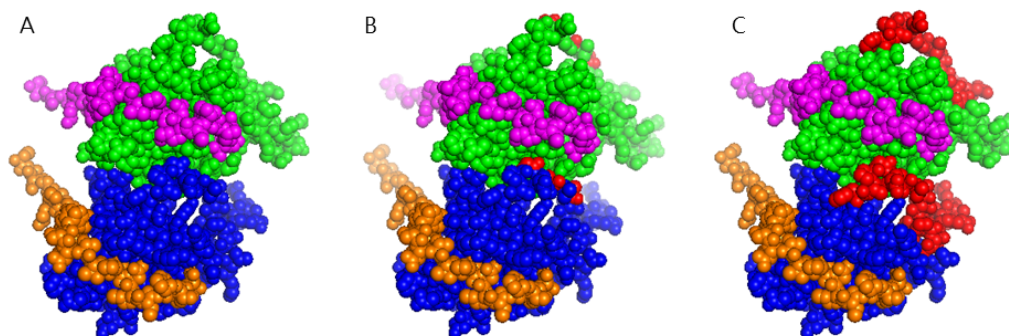


Abbildung 12: Proteinstrukturmodell der verschiedenen TraO-Varianten modelliert mit der PyMOL-Software. A: Dargestellt sind zwei benachbarte TraO (blau, grün) mit dem jeweils interagierendem TraN (orange, lila) aus dem T4SS. B: In TraO wurden die drei Aminosäuren, welche bei TraO-SQE im N-terminalen Teil ausgetauscht wurden, rot gefärbt. C: In TraO wurde der C-terminus rot gefärbt, dieser ist bei TraOshort deletiert.

Die Expression und Proteinrückfaltung der Varianten erfolgten analog zu TraO-126. TraOshort präzipitierte in der Rückfaltung und neigt zur Fragmentierung, wie in Abbildung 13 deutlich erkennbar ist. Um die Anwesenheit homologer TraO-Proteinkomplexe zu überprüfen, wurden die einzeln über die IEC gereinigten Proteinpräparationen durch Größenausschlusschromatographie nach Molekülgröße aufgetrennt. Zum Kontrollzweck wurde eine zusätzliche TraO-Variante (TraO-S7C) in der Größenseparation mitgeführt. Diese Variante enthält an Position 7 ein Cystein und zeigt in der nicht-reduzierenden SDS-PAGE (Abbildung 13) fast vollständig eine Bande in Höhe der doppelten Molekülmasse.

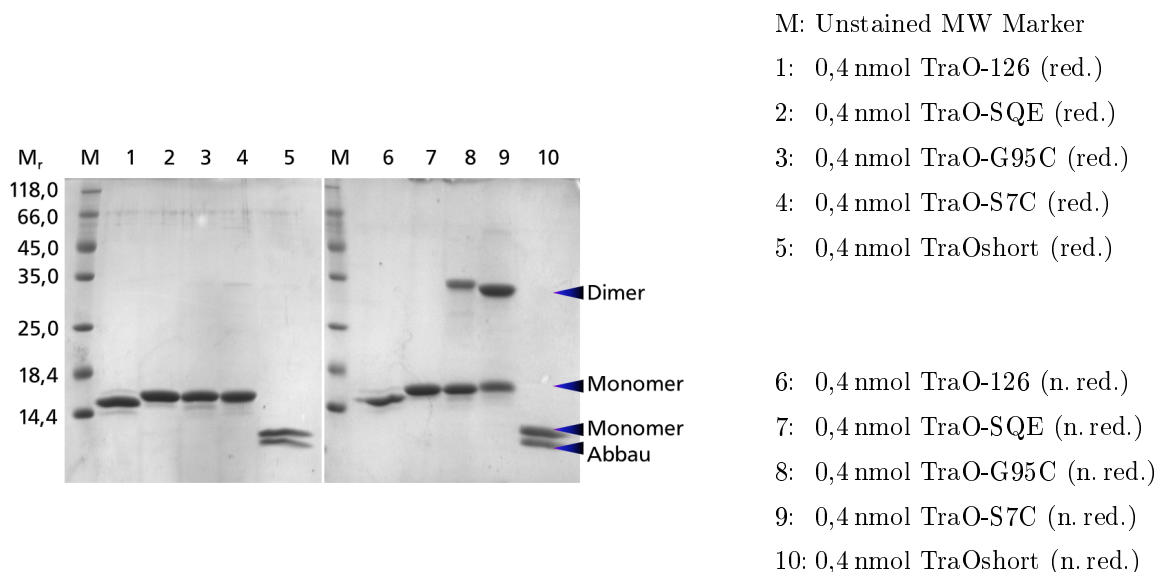


Abbildung 13: SDS-PAGE der TraO-Varianten mit anschließender Coomassie-Färbung. Im linken Gel wurden die Proben mit  $5 \times$  PPP versetzt und somit reduziert (red.), rechts wurden die Proben mit  $5 \times$  PPP (ohne  $\beta$ -Mercaptoethanol) versetzt und somit nicht reduziert (n. red.).

500  $\mu$ l der drei verschiedenen TraO-Varianten wurden mit einer Konzentration von 4 mg/ml auf die Säule geladen. In den Chromatogrammen (Abbildung 14,15,16) sind je zwei gut separierte Peaks erkennbar.

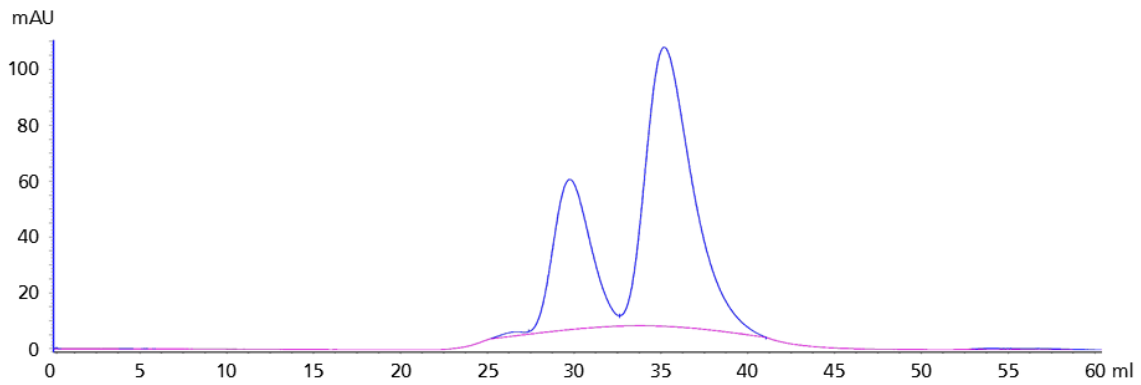


Abbildung 14: Chromatogramm der SEC von TraO-126. Die Flächen unter den Peaks wurden zur Berechnung der prozentualen Anteile an Monomeren und Dimeren verwendet. Diese werden in Tabelle 11 verglichen.

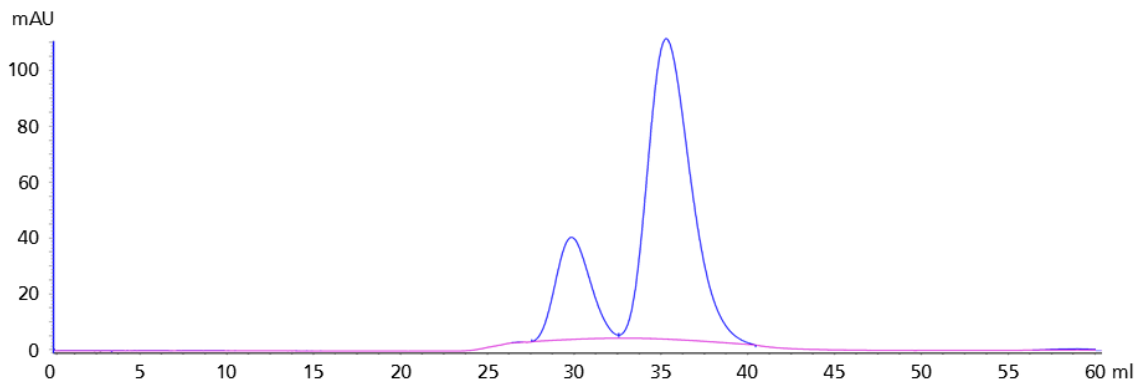


Abbildung 15: Chromatogramm der SEC von TraO-SQE. Die Flächen unter den Peaks wurden zur Berechnung der prozentualen Anteile an Monomeren und Dimeren verwendet. Diese werden in Tabelle 11 verglichen.

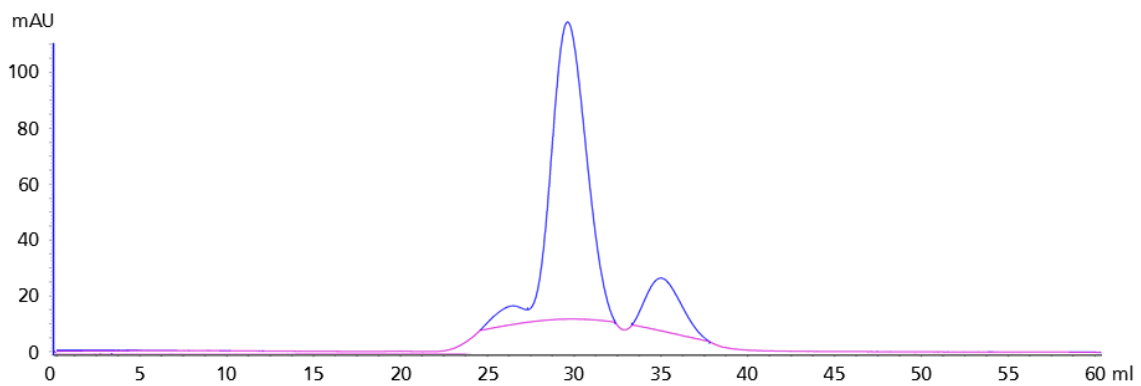


Abbildung 16: Chromatogramm der SEC von TraO-S7C. Die Flächen unter den Peaks wurden zur Berechnung der prozentualen Anteile an Monomeren und Dimeren verwendet. Diese werden in Tabelle 11 verglichen.

Das dimere Kontrollprotein TraO-S7C verteilt sich zum überwiegenden Teil im ersten Peak. Die vorgelagerte Schulter deutet auf oligomere TraO-Komplexe hin. In dem zweiten Peak sollten sich die Monomere der jeweiligen TraO-Varianten befinden. Anhand der berechneten Flächen der beiden Peaks wurde eine vorgenommen und in Tabelle 11 dargestellt. Oligomere wurden nicht berücksichtigt. Vergleicht man die

Tabelle 11: Vergleich der Peaks aus den drei Chromatogrammen der SEC von TraO-126, TraO-SQE und TraO-S7C

	TraO-126	TraO-SQE	TraO-S7C
Peak 1	$V_e = 29,75 \text{ ml}$ $A = 133,89 \text{ ml} \times \text{mAU}$ 28,9 %	$V_e = 29,83 \text{ ml}$ $A = 84,34 \text{ ml} \times \text{mAU}$ 21,4 %	$V_e = 29,78 \text{ ml}$ $A = 259,40 \text{ ml} \times \text{mAU}$ 84,8 %
Peak 2	$V_e = 35,18 \text{ ml}$ $A = 313,66 \text{ ml} \times \text{mAU}$ 71,1 %	$V_e = 35,30 \text{ ml}$ $A = 310,16 \text{ ml} \times \text{mAU}$ 78,6 %	$V_e = 35,30 \text{ ml}$ $A = 46,42 \text{ ml} \times \text{mAU}$ 15,2 %

Peaks der einzelnen Chromatogramme miteinander, entfallen für TraO-126 71,1 % auf Monomere, für TraO-SQE 78,6 % auf Monomere und für TraO-S7C 15,2 % auf Monomere. Aus den Daten der Größenseparation geht hervor, dass mit TraO-SQE eine Variante erzeugt werden konnte, die eine deutlich verringerte Dimerisierungsneigung hat. Da TraO-SQE, wie sich später zeigte (3.2.1), eine vergleichbare Affinität zu TraN besitzt wie TraO-126, wurde es für alle weiteren Versuche verwendet.

#### 3.1.4 Minimierung des TraN-Bindemotivs für technologische Anwendungen

Das TraN-Bindemotiv wurde mit dem Ziel der Minimierung und Anwendungsoptimierung sukzessive verkürzt und die Auswirkungen verschiedener Modifikationen auf die TraO-Bindung wurden untersucht. In das pRRSET-5b-TraNfull-TEV-GFP-HIS-Plasmid (3.1.2) wurden anstelle des TraNfull sieben weitere TraN-Varianten kloniert. Die Sequenz der erzeugten Fusionsproteine geht aus Abbildung 17 hervor.

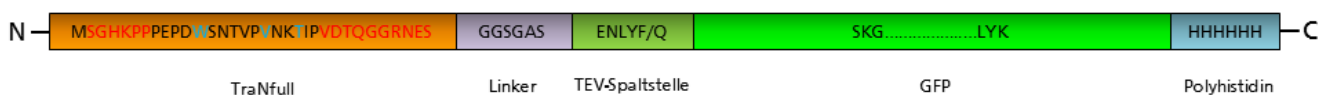


Abbildung 17: Schematischer Aufbau des TraNfull-GFP-Fusionsproteins. Hervorgehoben sind die C- und N- terminale Verkürzung der TraN-Sequenz (rot) und die vorgenommenen Mutationen in der TraN-Sequenz (blau).

Dabei wurde TraN N-terminal um 6 Aminosäuren verkürzt (TraNshortN), C-terminal um 10 Aminosäuren verkürzt (TraNshortC) und N- und C-terminal verkürzt (TraNshortNC). In der beidseitig verkürzten Variante wurde weiterhin an Position 12 Tryptophan gegen Alanin (TraNshortNC-W12A) und an Position 18 Valin gegen Alanin (TraNshortNC-V18A) ausgetauscht. Anders als bei TraO entspricht in diesem Fall die Nummerierung der Aminosäuren dem hier verwendeten Konstrukt. Eine weitere Anpassung stand im Zusammenhang mit einer in der TraN-Sequenz festgestellten möglichen N-Glykosylierungsstelle ("N-X-S/T"). Da das betroffene Asparagin an Position 19 innerhalb des konser-





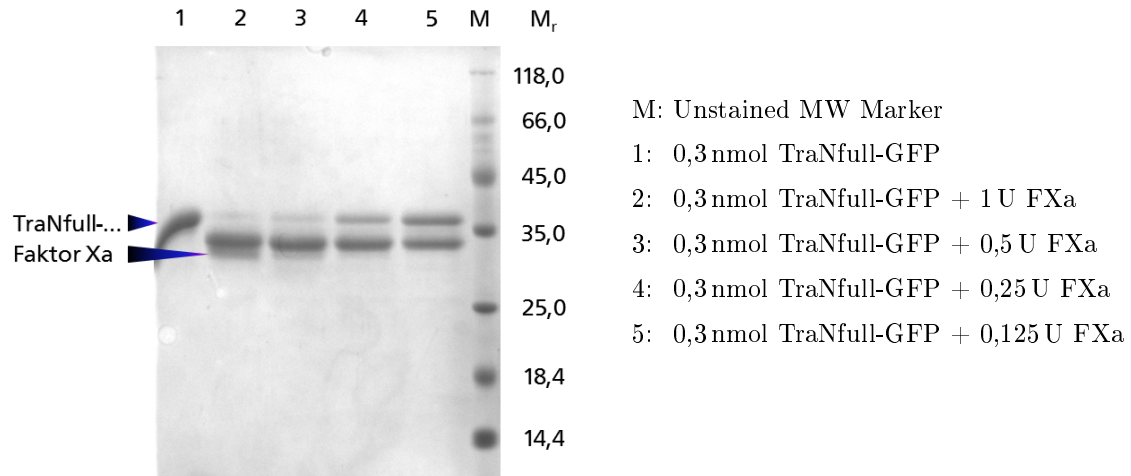


Abbildung 20: SDS-PAGE der Spaltung des TraNfull-Fusionsproteins mit unterschiedlichen Mengen Faktor Xa und anschließender Coomassie-Färbung.

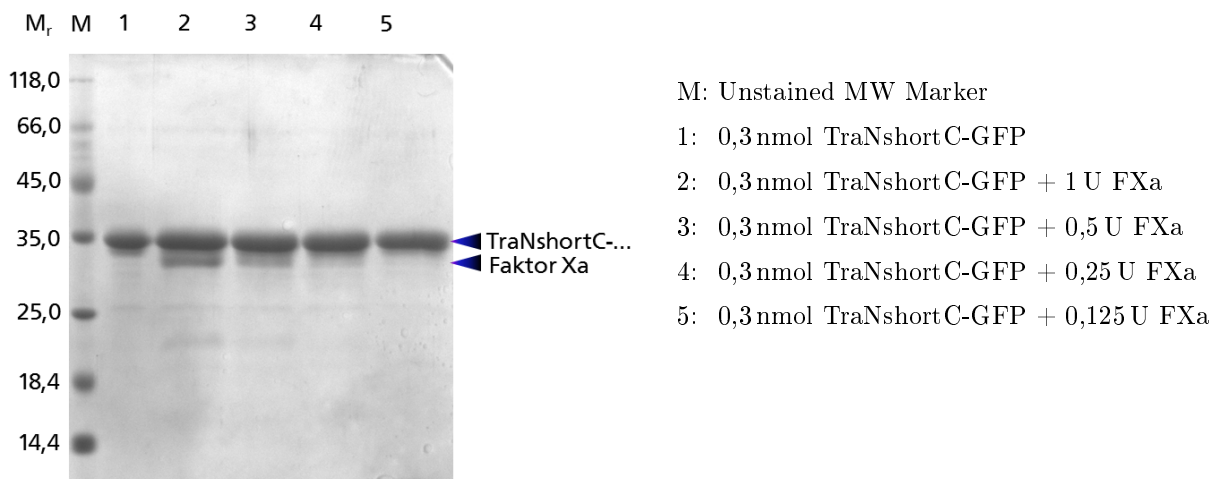


Abbildung 21: SDS-PAGE der Spaltung des TraNshortC-GFP-Fusionsproteins mit unterschiedlichen Mengen Faktor Xa und anschließender Coomassie-Färbung.

Die Inkubation mit Faktor Xa führt mit dessen steigender Konzentration zur Abnahme der TraNfull-GFP-Menge. Gleichzeitig erscheint eine neue Proteinbande mit leicht verringertem Molekulargewicht in der SDS-PAGE. Die TraNfull-GFP-Bande liegt bei etwa 36 kDa, die infolge der Faktor Xa-Spaltung entstehende Bande liegt bei etwa 33,5 kDa und somit nur knapp über der Proteinbande der zugegebenen Protease. Wird diese Inkubation mit TraNshortC-GFP durchgeführt, so bleibt die Proteinmenge im Größenbereich von 35 kDa konstant, einzig die Zunahme der Faktor Xa-Menge ist erkennbar.

---

## 3.2 Charakterisierung der Bindungseigenschaften der TraN- und TraO-Derivate

---

---

### 3.2.1 Funktionelle Überprüfung des rekombinant erzeugten TraO

---

Die verschiedenen TraO- und TraN-Derivate wurden als gereinigte Proteinpräparationen hinsichtlich ihrer Bindungseigenschaften eingehend analysiert. Einerseits musste die funktionelle Integrität des in vitro rückgefalteten TraO-Proteins überprüft werden. Andererseits galt es, Informationen über die Bindungskinetik der TraN-Volllängenvariante gegenüber TraO-126 bzw. TraO-SQE zu gewinnen. Anhand eines TraO-Pull-Down-Experiments mit immobilisiertem TraN-GFP sollte überprüft werden, ob ein ausreichend hoher Anteil des rekombinant hergestellten TraO-Proteins in der korrekten Struktur vorliegt, welche die Bindung an das TraN-Peptid ermöglicht.



Abbildung 22: Komponenten des TraO-Pull-Down auf Ni-NTA-Matrix. TraNfull-GFP wird über seinen His-Tag an Ni-NTA gebunden und anschließend mit TraO inkubiert. Beide Proteine interagieren miteinander und können gemeinsam eluiert werden.

Hierzu wurde TraNfull-GFP über Polyhistidin an eine Ni-NTA-Matrix gebunden und mit einer Konzentrationsreihe von TraO-126 bzw. TraO-SQE inkubiert. Die Proteine wurden von der Gelmatrix eluiert und per SDS-PAGE analysiert. Durch densitometrische Auswertung der Gele mit Hilfe des Programms GelAnalyser konnte eine Quantifizierung der molaren Verhältnisse zwischen TraO und TraN vorgenommen werden (Abbildung 23).

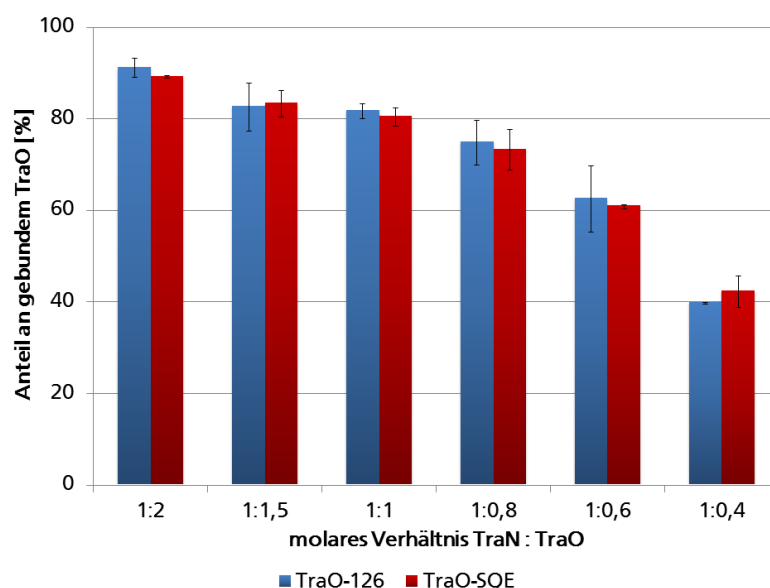


Abbildung 23: Darstellung der molaren Verhältnisse im TraO-Pull-Down-Experiment mit auf Ni-NTA-Matrix immobilisiertem TraNfull-TEV-GFP-HIS (TraNfull-GFP)

Aus dieser Analyse lässt sich feststellen, dass bei einer angebotenen Menge von **0,2 nmol** TraO eine Sättigung in der Bindung an das immobilisierte TraNfull-GFP (**0,2 nmol**) eintritt. Unter Berücksichtigung von möglichen Verlusten durch partielle Dissoziation von TraO-Molekülen während der Waschschrte des Pull-Down-Protokolls belegt das Ergebnis, dass mindestens 80 % des erzeugten TraO-126 bzw. TraO-SQE eine Bindung zu TraNfull herstellen und damit korrekt gefaltet vorliegen. Da es bei geringen Zugabemengen zu einer quasi äquimolaren Bindung von TraO und TraNfull-GFP kommt, ist davon auszugehen, dass beide TraO fast komplett richtig gefalten vorliegen und an TraN binden. TraO-126 und TraO-SQE unterscheiden sich in drei Aminosäuren, die außerhalb des TraN-Erkennungsbereichs liegen. Da die vorliegenden Ergebnisse bestätigen, dass die in TraO-SQE eingebrachten Veränderungen keine negativen Auswirkungen auf die strukturelle bzw. funktionelle Konformität des Proteins haben, gleichzeitig aber eine geringere Dimerisierungsneigung bei dem TraO-SQE belegt wurde (3.1.3), wurden alle weiteren Arbeiten lediglich mit TraO-SQE fortgeführt.

### 3.2.2 Evaluierung der Bindungsintensitäten der erzeugten TraN-Varianten gegenüber TraO-SQE

Ein weiteres Pull-Down-Experiment diente dazu, eine erste Einschätzung der Bindungsintensitäten der erzeugten TraN-Varianten gegenüber TraO-SQE zu erhalten. Die acht TraN-Varianten wurden über Polyhistidin an Ni-NTA-Beads gebunden und mit TraO-SQE im 5-fach molaren Überschuß inkubiert. Nach einem Waschschrte wurde das auf der Matrix gebundene Protein mit Imidazol eluiert und per SDS-PAGE mit anschließender Coomassie-Färbung analysiert. Die im Gel ersichtlichen Bandenintensitäten von TraO-SQE und dem jeweiligen TraN-Fusionsprotein wurden mit Hilfe des Programms GelAnalyser densitometrisch quantifiziert. Um daraus eine Abschätzung zu den jeweiligen Proteinmengen vornehmen zu können, wurden in einer parallel mitgeführten SDS-PAGE definierte Mengen an TraO-SQE (0,05 bis 0,15 nmol) und TraNshortN-GFP-HIS (0,04 bis 0,24 nmol) je fünf Mal aufgetragen. Mit GelAna-

lyser wurden die Intensitäten ermittelt, gegen die dazugehörigen Proteinmengen aufgetragen und eine Kalibriergerade erstellt (Abbildung 24).

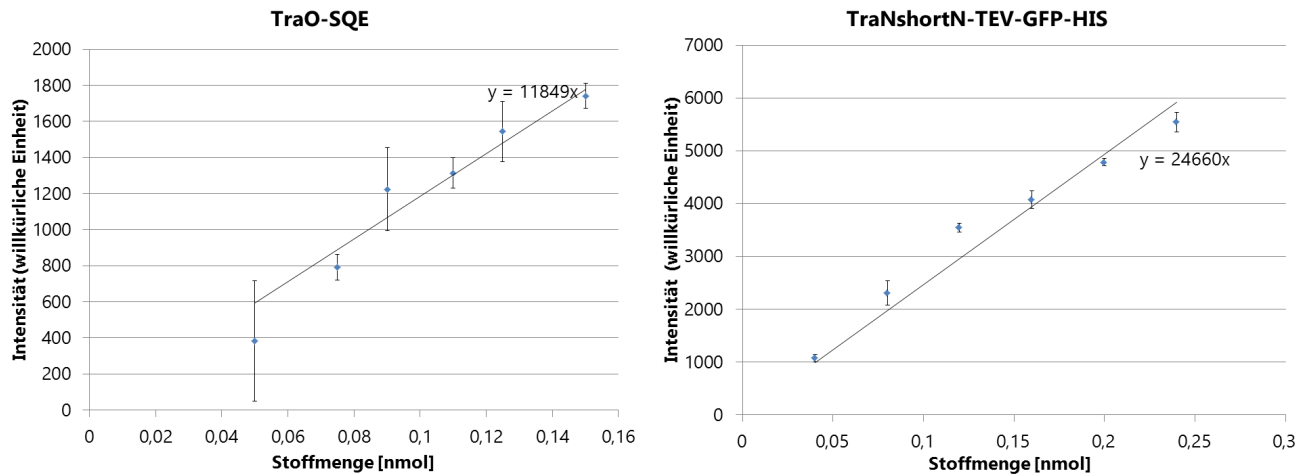


Abbildung 24: Darstellung der ermittelten Intensitäten in Abhängigkeit der aufgetragenen Proteinmengen und dazu gehörige Kalibriergeraden zur Abschätzung von Proteinmengen auf SDS-Gelen; links: für TraO-SQE; rechts: für TraNshortN-TEV-GFP-HIS

Die Ni-NTA-Matrix wurde zunächst mit je 0,2 nmol der verschiedenen TraN-Fusionsproteine inkubiert. Diese wurden anschließend alle mit je 1 nmol TraO-SQE versetzt, gewaschen und schlussendlich von der Ni-NTA-Matrix eluiert. Die Bandenintensitäten der Elutionsfraktionen wurden in der SDS-PAGE bestimmt. Mit Hilfe der Eichgeraden wurden daraus die Proteinmengen der acht verschiedenen TraN-Fusionsproteine sowie TraO-SQE errechnet und in Abbildung 25 dargestellt.

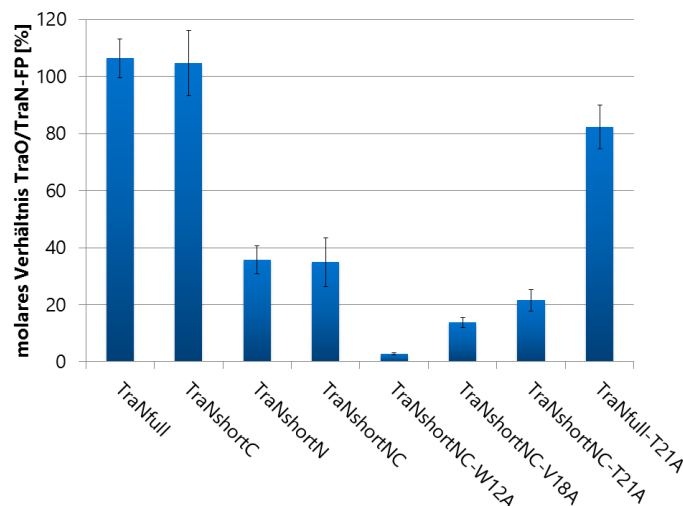


Abbildung 25: Vergleich der Bindungsintensitäten der TraN-Varianten gegenüber TraO-SQE. Darstellung der molaren Bindungsverhältnisse von TraO-SQE zu den verschiedenen TraN-Varianten, errechnet aus den Intensitäten der Proteinbanden der SDS-PAGE und den ermittelten Regressionsgleichungen.

---

Die Analyse im Anschluss an das Pull-Down-Experiment (Abbildung 25) ergab für das immobilisierte TraNfull-GFP, dass eine quasi äquimolare Menge an TraO-SQE präsent war (berechnetes Verhältnis TraO-SQE/TraNfull: 106 %). Die C-terminale Verkürzung von TraN wirkt sich nicht auf die Bindungseigenschaften aus (TraO-SQE/TraNshortC-GFP 105 %). Die N-terminal verkürzte Variante TraNshortN-GFP und das beidseitig reduzierte Minimalkonstrukt TraNshortNC zeigen hingegen ein stark verringertes Bindevermögen für TraO (TraO-SQE/TraNshortN-GFP 36 %, TraO-SQE/TraNshortNC-GFP 35 %). Die punktuellen Austausche von Aminosäuren innerhalb des N- und C-terminal verkürzten Konstrukts zeigten noch größere Verluste bei dem am immobilisierten TraN noch verbliebenen TraO-Protein. So erbrachte der Austausch von Threonin ein molares Verhältnis von 22 % und die Valin-Austauschvariante ein Verhältnis von 14 %. Beim Austausch von Tryptophan an Position 12 findet so gut wie keine Bindung mehr statt (TraO-SQE/TraNshort-W12A-GFP: 3 %). Deshalb wurde diese Variante in den folgenden Versuchen nicht mehr verwendet.

---

### 3.2.3 Evaluierung des Bindeverhaltens der TraN-Derivate gegenüber TraO-SQE (Anreicherung von TraN-Fusionsproteinen mit TraO-Gelmatrix)

---

Mit kovalent an eine Affigel-Festphase immobilisiertem TraO-SQE wurde eine weitere Abschätzung der Affinität zu den verschiedenen TraN-Varianten vorgenommen. Als Modellversuch wurde ein Pull-Down mit den zuvor beschriebenen TraN-GFP-Varianten (3.1.4) an zuvor hergestellte TraO-SQE-Matrix durchgeführt. Das Fusionsprotein TraNshortNC-W12A-TEV-GFP-HIS wurde nicht weiter mitgeführt. Aus der Ausgangsprobe sowie den Überständen des Pull-Down wurden die Fluoreszenzintensitäten (FI) quantifiziert. Damit war eine Abschätzung zu den jeweiligen Proteinmengen und zur Funktionalität des gebundenen GFP-Derivats möglich. Die gewonnenen Daten liefern Informationen darüber, welche TraN-Variante im Hinblick auf Anreicherung die besten Eigenschaften aufweist. In Ansätzen von je 200  $\mu$ l wurden die vorgelegten TraN-GFP Proben an die TraO-Matrix gebunden. Da vermutet wird, dass sowohl die Bindung als auch die Elution des TraN an TraO-Matrix langsam abläuft, wurde für das Pull-Down eine Inkubationszeit von 1 h bei RT gewählt. Abbildung 26 zeigt die gemessenen FI der jeweiligen TraN-GFP Varianten vor und nach der Inkubation mit der Matrix. Aus der Differenz der FI der Ausgangsprobe und der verbleibenden FI im Überstand nach TraO-Matrix-Inkubation lässt sich der Anteil an gebundenem Fusionsprotein errechnen.

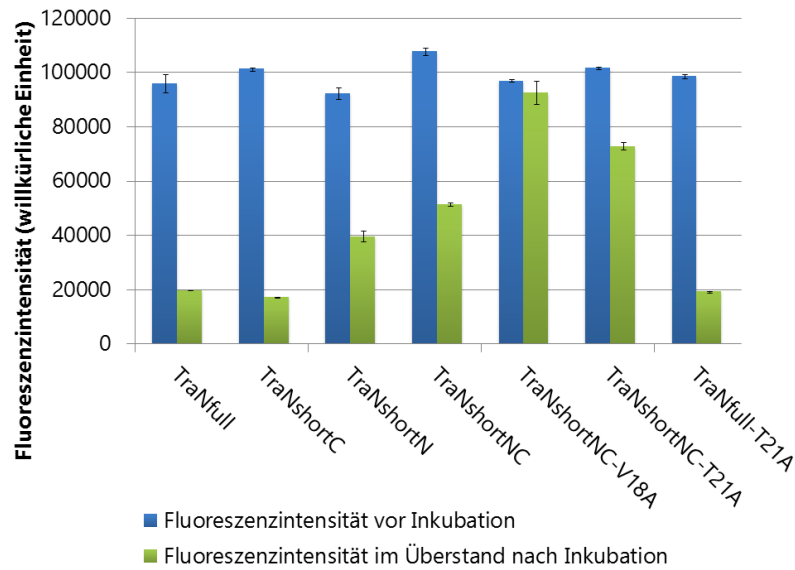


Abbildung 26: Darstellung der Fluoreszenzintensitäten der TraN-GFP-Derivatlösungen vor und nach Inkubation mit TraO-SQE-Matrix

In der fluorimetrischen Quantifizierung (Abbildung 26) zeigte sich, dass der weit überwiegende Teil des Volllängenkonstrukts TraNfull-GFP mit der TraO-Matrix aus der Probe extrahiert werden konnte, während für die Valin-Austauschvariante eine niedrige Bindungstendenz an das immobilisierte TraO festzustellen war. Die anderen TraN-Fusionsproteine lagen im Hinblick auf ihr Bindeverhalten graduell zwischen diesen beiden Varianten. Bei den Varianten TraNshortC-GFP und TraNfull-T21A-GFP lag der Matrix-gebundene Anteil nur unwesentlich unter dem des TraNfull-GFP. Alle N-terminal verkürzten TraN-Derivate lieferten erhöhte Anteile des jeweils ungebundenen GFP-Fusionsproteins.

---

### 3.3 TraN zur affinitätschromatographischen Reinigung rekombinanter Fusionsproteine am Beispiel humaner Zytokine aus *E.coli*

---

Der überwiegende Teil der bekannten Zytokine wird aufgrund seiner geringen Größe rekombinant aus *E.coli* gewonnen. Die Proteine werden entweder löslich gebildet oder in Form von unlöslichen IB gewonnen, aus denen sie anschließend durch spezifisch abgestimmte Rückfaltungsprotokolle in ihre native Form überführt werden. Die chromatographische Reinigung kann entweder auf Grundlage der intrinsischen proteinbiochemischen Eigenschaften des jeweiligen Zytokins (Molekulargewicht, Hydrophobizität, pI) oder unter Verwendung angefügter Affinitätstags erfolgen. Häufig ist eine anschließende Abspaltung der angefügten Tag-Sequenzen wünschenswert, damit die rekombinant erzeugten Zytokine insbesondere im Hinblick auf Funktionalität und Bioverfügbarkeit weitestgehend identisch zu ihren natürlichen Vorbildern sind.

---

#### 3.3.1 Anreicherung von TraN-Fusionsprotein als Bestandteil eines komplexen Proteingemisches an einer TraO-Matrix

---

Zunächst sollte nachgewiesen werden, dass TraO und TraN spezifisch miteinander interagieren und eine Extraktion von TraNfull aus komplexen Gemischen möglich ist. TraO-SQE wurde an Affigel-Matrix immobilisiert und das TraNfull-GFP aus dem Zelllysate (ZL) isoliert. Die Matrix wurde mit dem Lysat inkubiert, gewaschen und der Überstand verworfen. Anschließend wurden der Matrix PBS und SDS-Probenpuffer zugegeben und der Überstand in der SDS-PAGE analysiert.

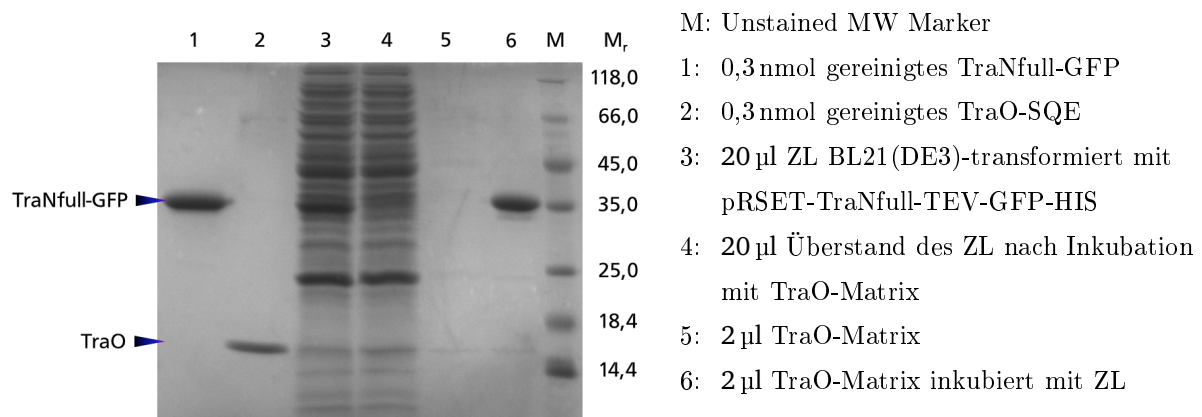


Abbildung 27: SDS-PAGE der Extraktion von TraNfull-GFP an TraO-Matrix aus einem *E.coli* BL21(DE3)-ZL.

Das Gel der SDS-PAGE (Abbildung 27) zeigt für die in den Kontrollspuren laufenden, chromatographisch gereinigten Proteine Größen von 35 kDa für TraNfull-GFP und 16 kDa für TraO. Das in Spur 3 aufgetragene ZL des mit TraNfull-GFP transformierten BL21(DE3) zeigt ein typisches Bandenmuster eines bakteriellen ZL, in welchem die dominante Bande in Höhe von 35 kDa für TraNfull-GFP läuft. Nach der Inkubation der Matrix ist diese Bande in der mobilen Phase nicht mehr dominant. Dafür wurde auf der Matrix TraNfull-GFP spezifisch angereichert (Spur 6). Neben diesem Protein sind im Gel nur



wenige andere Proteine als schwache Banden erkennbar. Bei Analyse der Matrix ist eine schwache Bande in Höhe des TraO erkennbar. Dieses Experiment belegt, dass eine Anreicherung von TraN-markiertem Fluoreszenzprotein an immobilisiertem TraO möglich ist.

### 3.3.2 Identifizierung der Elutionsbedingungen zur Aufhebung der reversiblen TraO/TraN-Interaktion

Im nächsten Schritt wurde untersucht, wie die gebundenen TraN-GFP-Proteine durch eine Auswahl von niedermolekularen Zusätzen von der TraO-Matrix abgelöst werden können, ohne dabei die Funktionalität des GFPs zu beeinträchtigen. Wie in 3.2.3 beschrieben, wurden die TraN-Fusionsproteine an einer TraO-Matrix angereichert. Im Anschluss erfolgten Elutionsversuche mit verschiedenen Puffern um zu ermitteln, welche TraN-Variante im Hinblick auf die Eluierbarkeit die besten Eigenschaften aufweist. Die Ansätze wurden nach der Inkubation und zweimaligem Waschen in PBS-T zur Elution mit den jeweiligen Puffern inkubiert. Es wurde für die Elution eine Inkubationszeit von 1 h gewählt, um eine vollständige Elution des TraN von der TraO-Matrix zu ermöglichen. Zur Aufhebung der Peptid-Protein-Wechselwirkung wurde zum einen das chemische Milieu im Allgemeinen durch einen hohen Salzgehalt (PBS, 1 M NaCl) und niedrigen pH-Wert (Glycin pH 2,0) verändert. Zusätzlich wurden Valin (0,5 M) und 2-Propanol (20 % (v/v)) als potenzielle Eluenten untersucht, die als Strukturanaloga zu dem für die TraO/TraN-Interaktion zentralen Valin gelten können. Als weiteres wurde Arginin aufgrund seiner bekannten Eigenschaft als Protein-Aggregationshemmer bzw. -Stabilisator eingesetzt. Die zunächst explorative Untersuchung enthielt fünf Pufferansätze, in denen die angegebenen Substanzen teilweise in Kombination vorlagen. Zum Zwecke der Kontrolle wurde in einem parallelen Ansatz die Elution durch Konkurrenz mit einem synthetisch erzeugten, verkürzten TraN-Peptid (AS 23-39) untersucht. Tabelle 12 zeigt die mit den eingesetzten Puffern von der Matrix eluierten Fluoreszenzintensitäten.

	<i>PBS-T</i>		<i>NaCl</i>		<i>Glycin pH 2.0</i>		<i>Arg/Val</i>		<i>Arg/2-Prop</i>		<i>TraN-Peptid</i>	
TraNfull	3286	4%	3463,5	5%	3673,5	5%	26047	34%	78146	103%	7453,5	10%
TraNshortC	3933,5	5%	2774,5	3%	4424	5%	29855	36%	72575	86%	9383	11%
TraNshortN	10994	21%	9416	18%	2349,5	4%	33556	64%	53549	102%	23759	45%
TraNshortNC	12147	22%	8769,5	16%	1918	3%	31169	55%	47376	84%	22949	41%
TraNshortNC-V18A	3826,5	89%	4085,5	95%	423,5	10%	4601	107%	7292,5	170%	3473,5	81%
TraNshortNC-T21A	12430	43%	9167	32%	1178,5	4%	17046	59%	23184	81%	15230	53%
TraNfull-T21A	7377	9%	5701	7%	3391	4%	30160	38%	71677	90%	20233	25%

Tabelle 12: Vergleich der Fluoreszenzintensitäten (willkürliche Einheit) für die Elution der verschiedenen TraN-GFP-Derivate. Für die jeweiligen Elutionspuffer sind die Ergebnisse in je zwei Spalten dargestellt. In der linken Spalte sind die errechneten Fluoreszenzintensitäten dargestellt, wobei rot hinterlegte Felder eine niedrige und grün hinterlegte Felder eine hohe Fluoreszenzintensität bedeuten. In der rechten Spalte wurde errechnet, welcher Anteil an gebundenem TraN-GFP aus 3.2.3 mit dem jeweiligen Puffer von der Matrix eluiert wurde. Rot hinterlegte Felder zeigen niedrige Werte, hohe Elutionsausbeuten sind blau hinterlegt.

Die ermittelten Fluoreszenzintensitäten (Tabelle 12) unter der Nutzung verschiedener Pufferansätze zeigen sehr unterschiedliche Elutionsausbeuten. Zu berücksichtigen ist die Menge an jeweils gebundenem TraN-Fusionsprotein (3.2.3). Alle TraN-GFP-Varianten wurden nahezu vollständig mit Argi-

---

nin / 2-Propanol-Ansatz von der Matrix eluiert. Besonders hoch ist der Wert für die Elution der Valin-Austauschvariante (170 %), die kaum an TraO bindet. Es handelt sich vermutlich um einen Messfehler im unteren Bereich der Detektionsgrenze. Die Valin-Austauschvariante wird von allen Pufferansätzen - außer mit Glycin - vollständig eluiert. Nach der Inkubation mit Glycin ist keines der TraN-Fluoreszenzproteine im Überstand detektierbar. Hierbei muss angemerkt werden, dass die Fluoreszenzaktivität von GFP in Glycin pH 2,0 verloren geht. Bei den Elutionsversuchen wurden die Glycin-Eluate deshalb mit 2 M Tris pH 8,0 neutralisiert. In einem Vorexperiment konnte durch Neutralisation des pH-Wertes mit 1/10 vol. 2 M Tris pH 8,0 die Fluoreszenzaktivität von TraNfull-GFP größtenteils wiederhergestellt werden. Im Anschluss zeigte sich jedoch, dass nach längerer Inkubation in Glycinpuffer (1 h) die fluorophore Struktur des GFP nicht wieder hergestellt werden kann. Bei Inkubation der Matrix mit PBS-T und NaCl wurden vergleichbare Mengen der jeweiligen TraN-Varianten von der Matrix gelöst, wobei PBS-T etwas mehr Protein von der Matrix löst als NaCl. Die TraN-Volllängenvariante und das C-terminal verkürzte TraN verbleiben nahezu vollständig auf der Matrix, die Volllängenvariante ohne Glycosylierungsstelle wird wenig gelöst. 15-22 % der beiden N-terminal verkürzten TraN-Varianten ohne Aminosäureaustausch werden bei der Inkubation der Festphase durch PBS-T bzw. NaCl gelöst. Das verkürzte TraN ohne Glycosylierungsstelle wird durch PBS-T bzw. NaCl deutlich von der Matrix gelöst (43 % bzw. 32 %). Der Arginin/Valin-Puffer löst etwa ein Drittel der an die TraO-Matrix gebundenen TraNfull-, TraNshortC und TraNfull-T21A-Fusionsproteine von der Matrix. Die N-terminal verkürzten Varianten TraNshortN-GFP, TraNshortNC-GFP und TraNshortNC-T21A-GFP wurden besser von der Matrix gelöst (55-64 %). Ein Teil des Fusionsproteins blieb, außer bei der Valin-Austauschvariante, immer am Sorbens. Mit dem verkürzten TraN-Peptid konnten nur geringe Mengen der Volllängen- und C-terminal verkürzten Variante (10 % bzw. 11 %) und ein Viertel der nichtglykosylierten Volllängenvariante gelöst werden. Die drei verbliebenen Konstrukte konnten etwa zur Hälfte eluiert werden (41-53 %), die andere Hälfte blieb auf der Matrix. Da mit dem Arginin / 2-Propanol-Puffer besonders hohe Ausbeuten erzielt werden konnten, wurden die Komponenten des Puffers etwas genauer untersucht. Dafür wurde TraN-GFP an die TraO-Matrix gebunden und mit fünf verschiedenen Pufferansätzen inkubiert. Dabei wurde der Arginin / 2-Propanol-Puffer modifiziert. Zum einen wurden Pufferkombinationen ohne Arginin verwendet. Außerdem wurde die 2-Propanol-Konzentration im Puffer auf 5 % herabgesetzt und Ethanol statt 2-Propanol verwendet. Die Elutionsergebnisse sind in Abbildung 28 dargestellt.

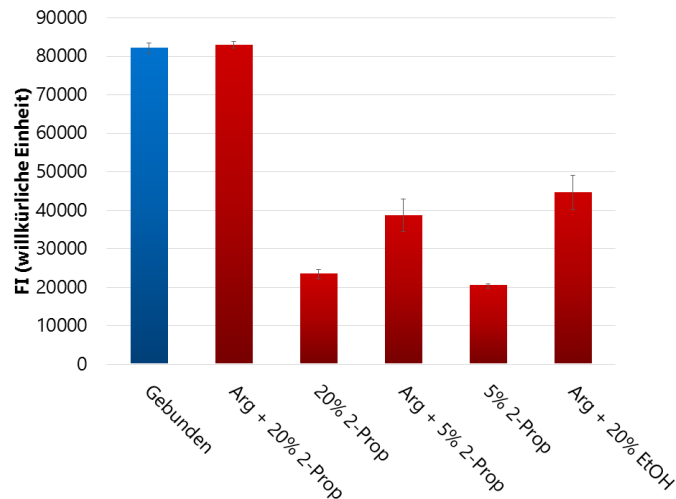


Abbildung 28: Vergleich der Fluoreszenzintensitäten für die Elution von TraNfull-GFP mit verschiedenen Puffern. Der blaue Balken bildet den errechnete Anteil an gebundenem Fluoreszenzprotein ab. Daneben sind in rot die errechneten Fluoreszenzintensitäten der verschiedenen Puffer, in denen inkubiert wurde, dargestellt.

Der Arginin / 2-Propanol-Puffer, in der bisherigen Zusammensetzung (0,5 M Arginin / 20 % 2-Propanol), war der einzige Puffer, der das Protein vollständig von der Matrix löst (siehe Abbildung 28). Wurde 2-Propanol durch Ethanol ersetzt, so konnte etwas mehr als die Hälfte des Fusionsproteins eluiert werden. Ein ähnliches Ergebnis konnte beobachtet werden, wenn die Konzentration des 2-Propanols auf 5 % gesenkt wird. Bei Inkubation mit Puffern ohne Arginin, war nur noch etwa ein Viertel des TraNfull-GFP von der Festphase im Überstand nachweisbar. Das gilt für Puffer mit 20 % 2-Propanol und ebenso für Puffer mit 5 % 2-Propanol. In allen folgenden Versuchen wurde auf Grund der Ergebnisse mit Arginin / 2-Propanol eluiert.

### 3.3.3 Bindekapazität der TraO-Matrix

Es wurde untersucht, wie viel TraNfull-TEV-GFP-HIS maximal an die hergestellte TraO-Matrix bindet. Dazu wurden 10 µl TraO-Affigel-Matrix vorgelegt und mit steigenden Konzentrationen an TraNfull-GFP (5-100 µg) inkubiert. Nach einstündiger Inkubation wurde die Fluoreszenzintensität der Überstände ermittelt und daraus der Anteil an gebundenem Protein errechnet. Die vorgelegten und gebundenen Proteinmengen wurden im Diagramm in Abbildung 29 dargestellt.

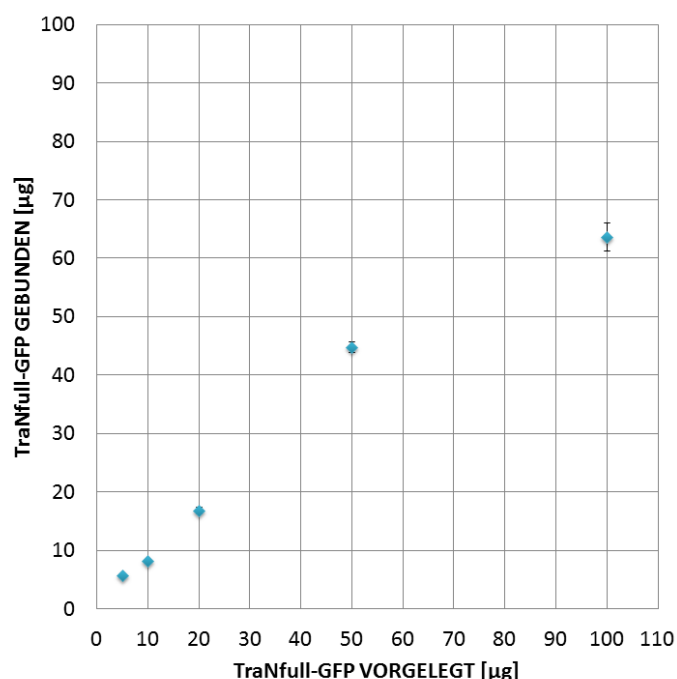


Abbildung 29: Bestimmung der Bindekapazität der TraO-Matrix. Die Matrix wurde mit einer TraNfull-GFP-Konzentrationsreihe inkubiert und aus der FI des Überstandes gebundener und ungebundene Anteil errechnet.

Bis zu einer Menge von etwa 50 µg TraNfull-GFP interagierte das angebotene Fluoreszenzprotein fast vollständig mit der Festphase und die Kurve im Diagramm verläuft linear. Oberhalb dieser Proteine-menge erreichte die Bindekapazität der Matrix ihre Sättigung. Bei einer angebotenen Menge von 100 µg Fluoreszenzprotein wurden etwa 62 µg an die Matrix gebunden. Somit beträgt die Bindungskapazität der Matrix für TraNfull-GFP mindestens 6 µg/µl, was etwa 200 nmol/ml entspricht.

---

### 3.3.4 Wiederverwendbarkeit der TraO-Matrix

---

Es wurde untersucht, ob die TraO-Affinitätsmatrix nach Elution des TraNfull-Fusionsproteins regenerierbar und wiederverwendbar ist. Dazu wurde wie in 3.2.3 und 3.3.2 beschrieben TraNfull-GFP an die Matrix gebunden und mit Arginin / 2-Propanol-Puffer von der Matrix eluiert. Die Matrix wurde nach Regeneration wieder mit TraNfull-GFP beladen und eluiert. Zur Regeneration wurde die Matrix nach der Elution mit Glycin pH 2,0 und anschließend drei Mal mit PBS-T gewaschen, zentrifugiert und die Überstände verworfen.

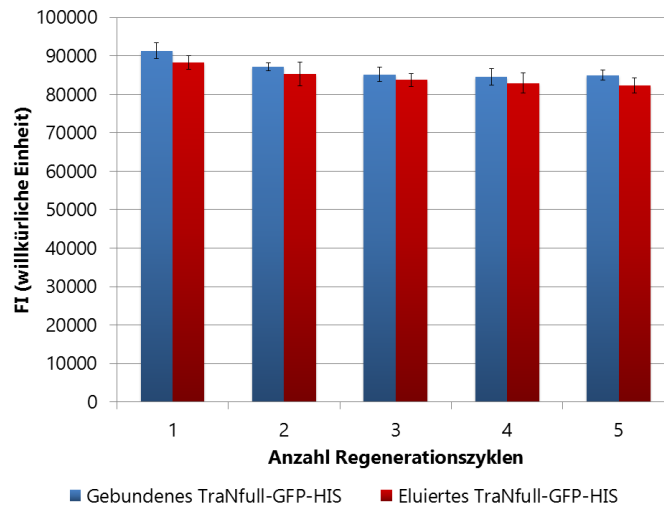


Abbildung 30: Evaluierung der Wiederverwendbarkeit der TraO-Matrix. Die Matrix wurde je fünfmal mit TraNfull-GfP inkubiert, eluiert und regeneriert.

Die Fluoreszenzintensitäten wurden aus den wässrigen Lösungen ermittelt. Beladung, Elution und Regeneration wurden insgesamt je fünf mal durchgeführt und die gemessenen und berechneten durchschnittlichen Fluoreszenzen graphisch dargestellt (Abbildung 30). Die Menge an gebundenem und eluiertem Fusionsprotein mit erneuter Verwendung der regenerierten Matrix nimmt geringfügig ab. In diesem Versuch wurde weniger eluiertes TraNfull gemessen, als nach den Berechnungen an die Matrix gebunden hat. Ein geringer Anteil verbleibt bei der Elution auf der Matrix.

### 3.3.5 Steigerung der Expressionsausbeuten schlecht exprimierbarer Zytokine durch die N-terminale Fusion von TraN

Dem Labor lagen einige Expressionskonstrukte mit wildtypischen (wt) cDNA-Sequenzen für Zytokine vor, mit denen sich in *E. coli* nur eine unzureichende bzw. kaum nachweisbare Proteinsynthese erzielen ließ. Von diesen humanen Proteinen wurde der Makrophagen-Wachstumsfaktor (human murine macrophage colony-stimulating factor, hM-CSF), der Granulozyten-Wachstumsfaktor (human granulocyte colony-stimulating factor, hG-CSF) und der Fibroblasten-Wachstumsfaktor-9 (human fibroblast growth factor-9, hFGF-9) ausgewählt, um zu untersuchen, ob durch Modifikation der Expressionskassette eine Verbesserung der Expressionsrate erzielt werden kann. Zusätzlich wurde der humane Tumornekrosefaktor-alpha (hTNF- $\alpha$ ) als Fallbeispiel mitgeführt, von dem bekannt war, dass er in *E. coli* effizient exprimiert wird (S. Krause, persönliche Kommunikation). Mittels PCR wurden die für die Zytokine codierenden cDNA-Sequenzen am 5' Ende so erweitert, dass eine N-terminale Fusion der TraN-Sequenz (AS<sub>WT</sub> 17-48) an den resultierenden Proteinen hergestellt wurde (Abbildung 31). Statt der bisher verwendeten TEV-Proteasespaltstelle (3.1.2) wurde eine Faktor Xa-Proteasespaltstelle eingefügt, dadurch kann der Tag posttranslational vollständig vom Zytokin abgespalten werden.



Abbildung 31: Schematischer Aufbau eines TraN-markierten Zytokins. Zwischen der C-terminalen TraNfull-Sequenz und den N-terminalen Sequenzen für verschiedene Zytokine wurde eine Linker-Sequenz und eine Faktor Xa-Spaltstelle kloniert. Die Konstrukte werden in ein pRSET-5b-Plasmid kloniert und zur Expression gebracht.

Die kodierenden Sequenzen wurden in den Vektor pRSET-5b ligiert und in BL21(DE3) zur Expression gebracht. Zum Vergleich wurde in demselben Stamm eine Expressionsanalyse der ursprünglichen Plasmide pRSET-hM-CSF, pRSET-hG-CSF, pRSET-hFGF-9 und pRSET-hTNF- $\alpha$  ohne das aminoterminal TraN durchgeführt (Abbildung 32).

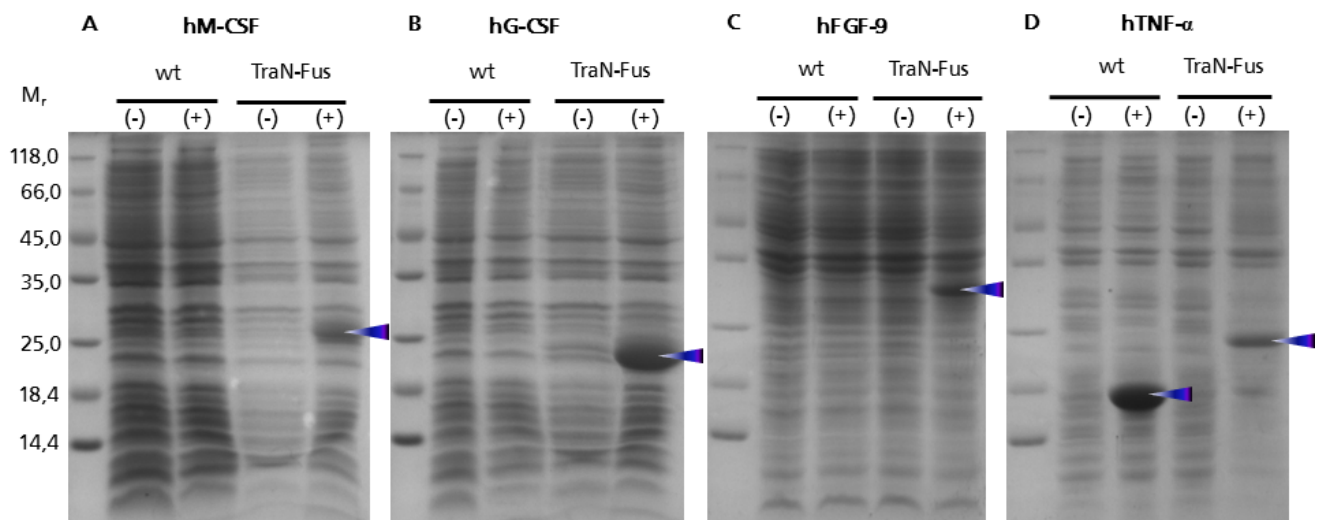


Abbildung 32: Vergleich der Expressionsausbeuten wildtypischer und modifizierter Zytokine – Vergleich von ungetaggt mit ihren korrespondierenden TraN-fusionierten Konstrukten in einer SDS-PAGE-Auftrennung mit anschließender Coomassie-Färbung. Die vier Zytokine hM-CSF (A); hG-CSF (B), hFGF-9 (C) und hTNF- $\alpha$  (D) wurden als wildtypische (wt) und TraN-fusionierte (TraN-Fus) pRSET-5b-Plasmidkonstrukte in *E. coli* BL21(DE3) transformiert und der unstimulierte Zustand (-) mit der Induktion durch IPTG (+) verglichen. Die Markierungen zeigen die durch die Induktion entstandenen Banden.

Bei den Transformanten der ursprünglichen Expressionsplasmide pRSET-hM-CSF, pRSET-hG-CSF und pRSET-hFGF-9 zeigte sich keine Expression in der SDS-PAGE. Demgegenüber war bei den TraN-getaggt Derivaten von hM-CSF, hG-CSF und hFGF-9 eine deutliche Expression festzustellen. Nach dreistündiger Induktion sind Proteinbanden im Größenbereich von 27 kDa für TraN-hM-CSF, 23 kDa für TraN-hG-CSF, 30 kDa für TraN-hFGF-9 und 24 kDa für TraN-hTNF- $\alpha$  nachweisbar (Abbildung 32 A - D). Diese entsprechen in etwa den berechneten Größen der Proteine: 22,8 kDa für TraN-hM-CSF, 23,1 kDa für TraN-hG-CSF, 27,7 kDa für TraN-hFGF-9 und 21,3 kDa für TraN-hTNF- $\alpha$ . Für den hTNF- $\alpha$  lieferte das wildtypische Expressionskonstrukt eine bessere Expression im Vergleich zur N-terminalen TraN-Fusion.

### 3.3.6 Realisierung einer hochspezifischen Aufreinigung von TraN-Zytokin-Fusionsproteinen

Zytokine mit N-terminal fusioniertem TraN-Peptid wurden an einer TraO-Matrix affinitätschromatografisch gereinigt und eluiert. Die drei Proteine TraN-hM-CSF, TraN-hG-CSF und TraN-hFGF-9 (3.3.5) wurden nach der Expression in Inclusion Bodies und Zelllysate getrennt. TraN-hM-CSF und TraN-hG-CSF lagen sowohl in IB, als auch löslich im ZL vor. TraN-hFGF-9 bildete keine IB und lag ausschließlich im ZL vor. 100 mg IB von TraN-hM-CSF und TraN-hG-CSF wurden solubilisiert, denaturiert und durch Zugabe von Standard-Rückfaltungs-Puffer zurückgefalten. Alle Proteinlösungen wurden gegen das einhundertfache Volumen PBS dialysiert und geklärt. Die TraO-Matrix wurde anschließend mit den fünf verschiedenen Proteinlösungen inkubiert und nach dreimaligem Waschen mit PBS-T mit Arginin / 2-Propanol-Puffer eluiert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 33 dargestellt.

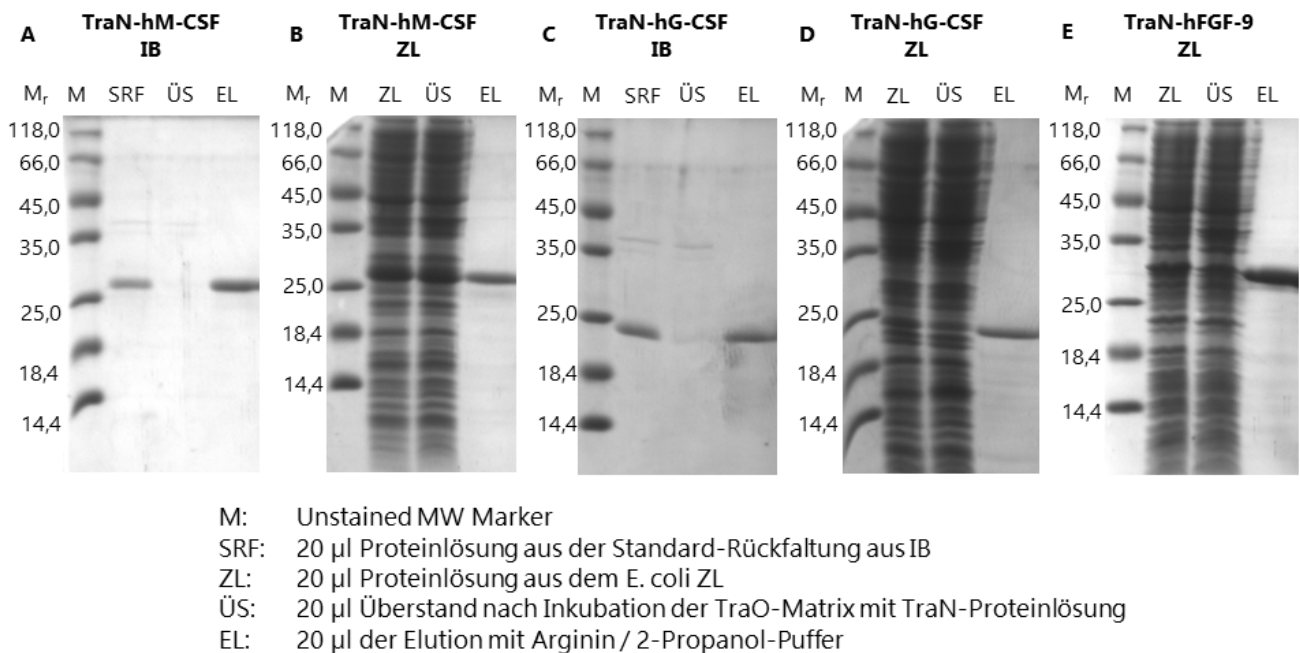


Abbildung 33: SDS-PAGE der Aufreinigung von TraNfull getaggtten Zytokinen mit anschließender Coomassie-Färbung. Aufgetragen wurden jeweils die Proteinlösungen vor und nach der Inkubation mit Tra-Matrix und die Elution von TraN-hM-CSF aus IB (A); TraN-hM-CSF aus einem *E. coli*-ZL (B); TraN-hG-CSF aus IB (C); TraN-hG-CSF aus einem *E. coli*-ZL (D); TraN-hFGF-9 aus einem *E. coli*-ZL (E).

In den Spuren der aufgetragenen Proteinlösungen aus IB-Rückfaltung sind in der SDS-PAGE wieder dominante Proteinbanden im Größenbereich von 27 kDa für TraN-hM-CSF und 23 kDa für TraN-hG-CSF zu erkennen (Abbildung 33 A und C). Nach der Inkubation mit TraO-Matrix sind diese Banden im Überstand der Lösungen nicht mehr nachweisbar. Die spezifisch an der Matrix angereicherten Proteine konnten mit Arginin / 2-Propanol-Puffer eluiert werden. Dabei sind keinerlei Verunreinigungen erkennbar. Im ZL der Lösungen mit den beiden genannten Targets sind deren Proteinbanden ebenfalls sichtbar, im ZL von hFGF-9 ist eine zusätzliche Bande bei 30 kDa erkennbar. Ansonsten sind die typischen SDS-PAGE-Bandenmuster eines bakteriellen ZL abgebildet (Abbildung 33 B, D und E). Nach der Inkubation mit der stationären Phase sind diese Proteinbanden in den ZL immer noch offensichtlich, ein Teil des

Fusionsproteins bleibt in der Lösung. In den Elutionen sind die an der TraO-Matrix angereicherten TraN-Fusionsproteine nachweisbar. Die Elution der Fusionsproteine war unvollständig, es kommt es zu einer teilweisen Präzipitation auf der Matrix und so konnten nur etwa 60 - 70 % der Fusionsproteine eluiert werden (Daten nicht gezeigt). Es ist zu erkennen, dass die Aufreinigungen aus ZL keine Reinheit von  $> 95\%$  aufweisen. Im weiteren Verlauf wurde TraN-hM-CSF unter Verwendung von etwa 50  $\mu\text{l}$  TraO-Matrix aus IB und ZL aufgereinigt, dabei konnten jeweils etwa 200  $\mu\text{g}$  Fusionsprotein gewonnen und im anschließenden Aktivitätstest verglichen werden. TraN-hFGF-9 wurde, da bisher keine andere Prozedur zur Herstellung eines rekombinanten Zytokins etabliert werden konnte, im Großmaßstab aufgereinigt (10 ml TraO-Matrix, Daten nicht gezeigt). Die Elution war allerdings für eine kommerzielle Weiterverwendung nicht ausreichend und die anschließende Abspaltung von TraN mit Faktor Xa ist ineffizient, es muss zu viel Protease zur Spaltung einer ausreichenden Menge des Fusionsproteins eingesetzt werden. Ein Aktivitätstest für hFGF-9 ist nicht verfügbar.

### 3.3.7 Aktivität von TraN-markierten Zytokinen am Beispiel des TraN-FX-hM-CSF-Reporterassays

Die biologische Aktivität von TraN-hM-CSF sollte mit einem kommerziell erhältlichen hM-CSF verglichen werden. Ba/F3-Zellen wurden starviert, transfiziert und ausgesät. Die Zellen wurden dann mit unterschiedlichen Konzentrationen hM-CSF-Referenz (1 - 100  $\text{ng}/\mu\text{l}$ ) bzw. TraN-hM-CSF aus IB und ZL stimuliert (beide 10 - 1000  $\text{ng}/\mu\text{l}$ ), inkubiert und ein Luciferaseassay durchgeführt. Die verwendeten Konstrukte und die Methode wurden entwickelt und zur Verfügung gestellt von Dr. Andreas Wohlmann. Das Ergebnis ist in Abbildung 34 dargestellt.

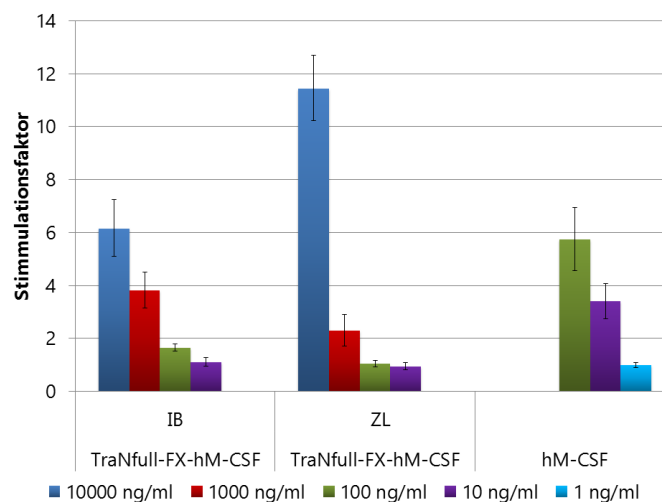


Abbildung 34: Bestimmung der biologischen Aktivität von TraNfull-FX-hM-CSF im Vergleich zu hM-CSF mittels Reporterassay auf Ba/F3-Zellen

Im Reporterassay benötigt man mehr als die zehnfache Menge an TraN-hM-CSF um eine dem wild-typischen hM-CSF vergleichbare Aktivität zu erreichen.



---

## 3.4 Das TraO/TraN-System als neuer Zugang zur effizienten und zielgerichteten Markierung von Proteinen

---

---

### 3.4.1 TraO-Fluoreszenzprotein-Hybride zur Markierung TraN-fusionierter Rezeptoren

---

Lösliche Rezeptorketten können mit dem TraN-Peptid fusioniert werden, welches durch ein TraO-Fluoreszenzprotein markiert und nachgewiesen werden kann. Dies eröffnet die Möglichkeit der Untersuchung der Rezeptor/Zytokin-Interaktion auf mehrere Arten. Beispielsweise kann ein Zytokin auf einer Agaroseoberfläche nachgewiesen werden (3.4.2). Zunächst wurden die löslichen Rezeptorketten des murinen Koloniestimulationsfaktor 1 Rezeptors (murin colony stimulating factor 1 receptor, mc-FMSR) und des human thymic stromal lymphopoietin-Rezeptor  $\alpha$ -Kette (hTSLP $\alpha$ ) durch PCR-Klonierungsstrategien um einen C-terminalen Polyhistidin-Tag (10  $\times$ ) sowie das TraNshortNC-T21A-Peptid erweitert (Abbildung 35). Der gewünschte eukaryontische Expressionsvektor wurde durch Klonierung in das pcDNA3.1-zeo-Plasmid gewonnen. N-terminal besitzen die Konstrukte ein Signalpeptid, welches im Falle des mc-FMSR das rezeptoreigene ist, im Falle des hTSLP $\alpha$  handelt es sich um das Signalpeptid der humanen Interleukin-4 Rezeptor  $\alpha$ -Kette (hIL-4 $\alpha$ ). Anschließend wurden die entstandenen Konstrukte in HEK293T-Zellen transfiziert und stabil exprimierende Zelllinien selektioniert. Die Zellen wurden kultiviert, die Mediumüberstände gesammelt und die resultierenden Proteine mc-FMSR-HIS-TraNshortNC-T21A (mc-FMSR-TraN) und hTSLP $\alpha$ -HIS-TraNshortNC-T21A (hTSLP $\alpha$ -TraN) über Ni-NTA aufgereinigt und analysiert (Daten nicht gezeigt). Eine Erweiterung des löslichen Rezeptors um das TraNfull-T21A-Peptid wurde ebenfalls kloniert, eine stabile Zelllinie zur Herstellung ausreichender Proteinmengen konnte nicht etabliert werden.



Abbildung 35: Schema einer löslichen Rezeptorkette mit N-terminalem Signalpeptid und C-terminal eingefügtem 8  $\times$  Histidin, sowie dem TraNshortNC-T21A, verbunden durch Linker-Sequenzen (L). Die Konstrukte wurden in pcDNA3.1-zeo-Plasmide kloniert und zur Expression gebracht.

Zum Nachweis der löslichen Rezeptoren werden markierte TraO-Moleküle benötigt. Dazu wurde das Konstrukt des teal fluorescent protein (TFP, [121]) aus dem Plasmid mTFP-N1 über PCR-Techniken N- und C-terminal um die TraO-SQE-Sequenz erweitert und das entstandene Konstrukt (Abbildung 36) in einen bakteriellen Expressionsvektor kloniert. Das resultierende Plasmid pRSET-TraO-TFP-TraO wurde in BL21(DE3) zur Expression gebracht und das entstandene Fusionsprotein in diesem Versuch als filtriertes ZL verwendet, außerdem wurde ein Teil des Proteins mittels chromatographischer Methoden für die spätere Verwendung gereinigt.

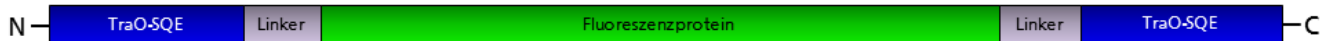


Abbildung 36: Schematischer Aufbau eines TraO-TFP-TraO-Fluoreszenzproteins mit den N- und C-terminalen TraO-SQE Proteinen, welche das TFP flankieren. Das Konstrukt wurde in einen pRSET-5b-Plasmid kloniert und zur Expression gebracht.

Zunächst wurde untersucht, ob die löslichen Rezeptoren mc-FMSR-TraN und hTSLPRa-TraN gleichzeitig ihren Liganden und TraO-TFP-TraO binden können. Dazu wurden die Rezeptoren über Polyhistidin an Ni-NTA-Matrix gebunden und mit Rezeptor, Ligand und Sonde inkubiert. Der Versuchsablauf ist in Abbildung 37 skizziert. Der gesamte Komplex kann eluiert und analysiert werden.

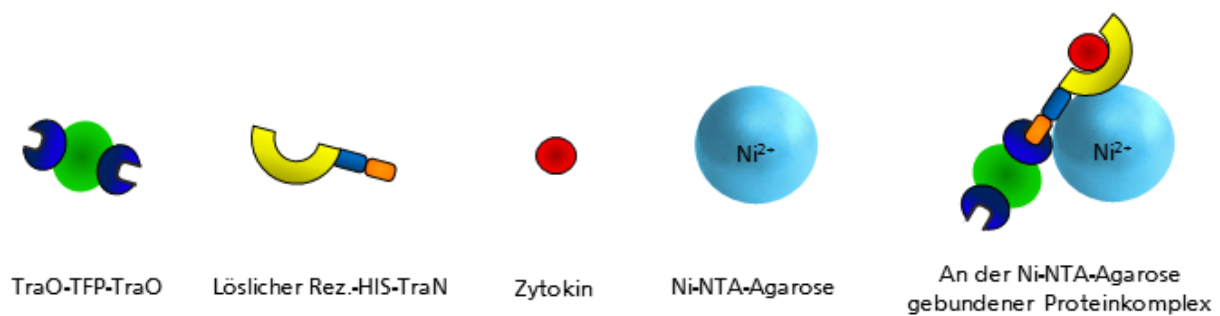


Abbildung 37: Komponenten für den Nachweis der Bindung eines Zytokins bei gleichzeitiger TraO-TFP-TraO-Bindung an den komplementären, TraN-markierten, löslichen Rezeptor. Der gesamte Komplex bindet über Polyhistidin am löslichen Rezeptor an Ni-NTA-Agarosematrix und kann gemeinsam eluiert werden.

Die Ni-NTA-Matrix wurde mit mc-FMSR-TraN bzw. hTSLPRa-TraN inkubiert und gewaschen. Danach wurden Ansätze 30 min bei RT unterschiedlich inkubiert. Als Erstes wurde ausschließlich eine äquimolare Menge an murinem Macrophagen-Wachstumsfaktor (murine macrophage colony-stimulating factor, mM-CSF) bzw. human thymic stromal lymphopoietin(hTSLP) zugesetzt um die Rezeptor/Liganden-Interaktion nachzuweisen. Im zweiten Ansatz wurde ausschließlich die TraO-TFP-TraO-Sonde zugegeben. Parallel wurden Ligand und Sonde gleichzeitig zugegeben. Nach der Bindung und dem erneuten Waschen wurde mit Imidazol eluiert und die Proben in der SDS-PAGE analysiert (Abbildungen 38 und 39).

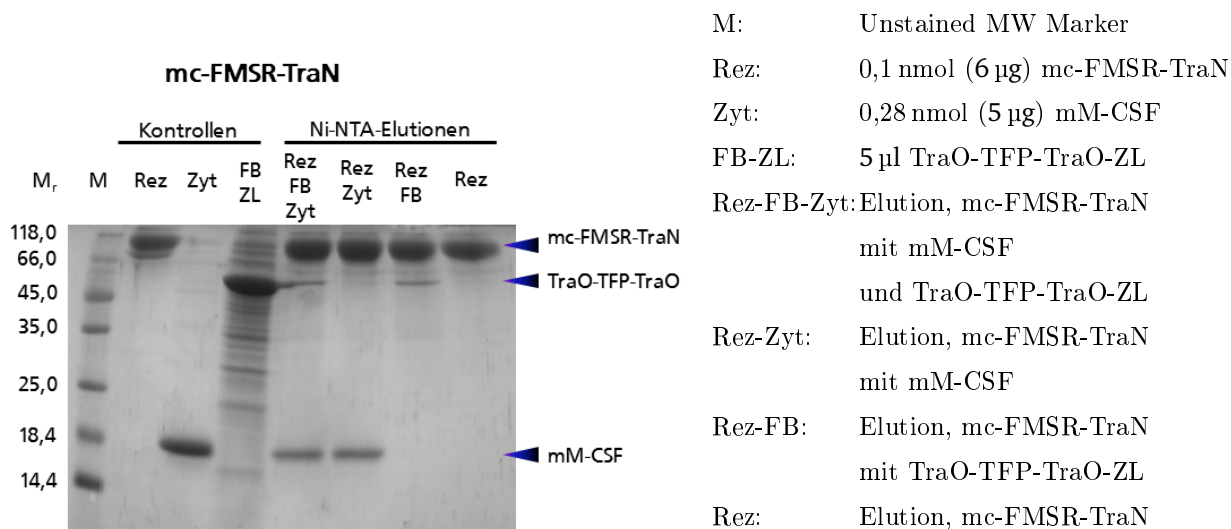


Abbildung 38: SDS-PAGE für den Nachweis der Bindung des mM-CSF-Zytokins bei gleichzeitiger TraO-TFP-TraO-Bindung an den löslichen Rezeptor mc-FMSR-TraN.

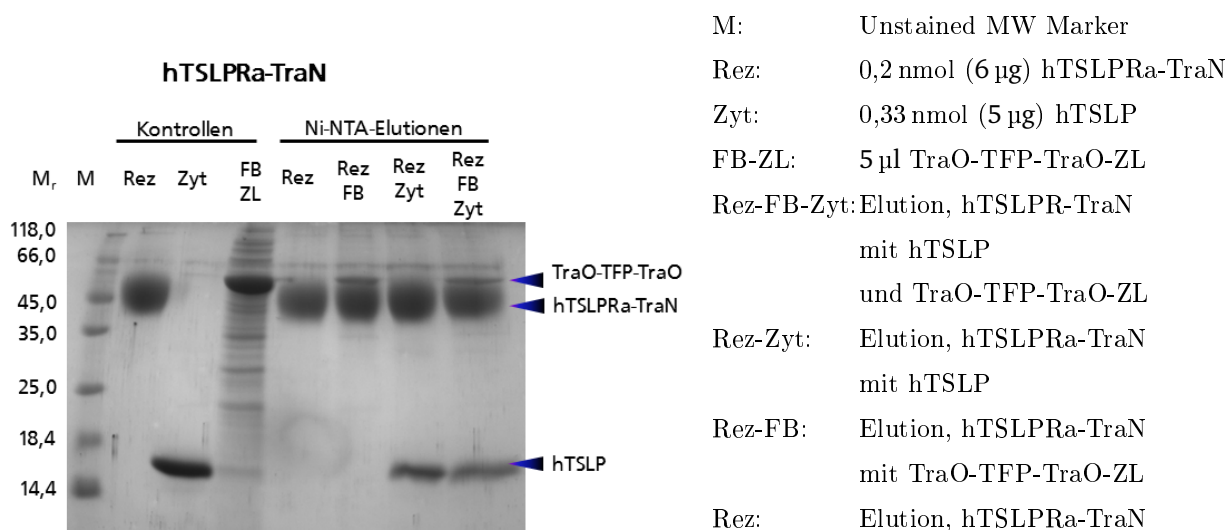


Abbildung 39: SDS-PAGE für den Nachweis der Bindung des hTSLP-Zytokins bei gleichzeitiger TraO-TFP-TraO-Bindung an den löslichen Rezeptor hTSLP Ra-TraN.

Die Ergebnisse sind für beide lösliche Rezeptoren ähnlich. In den Kontrollspuren der SDS-Gele für mc-FMSR-TraN (Abbildung 38 und 39) sind die dominanten Proteinbanden bei 60 - 100 kDa für mc-FMSR-TraN, bei 18 kDa für mM-CSF, bei 45 - 70 kDa für hTSLP Ra-TraN, bei 16 kDa für hTSLP und 50 kDa für das TraO-Fluoreszenzprotein-Hybrid mit dem typischen Bandenmuster eines ZL im Hintergrund, zu erkennen. Aus den Bandenintensitäten im SDS-Gel können die jeweiligen Proteinmengen an gebundenem bzw. eluiertem Rezeptor, Ligand und gebundener bzw. eluierter Sonde abgeschätzt werden. Die vorgelegte

Menge an mc-FMSR-TraN bzw. hTSLPRa-TraN bindet vollständig an die Matrix und wird wieder eluiert, unabhängig von der etwaigen Bindung von Ligand und Sonde. Bei äquimolarer Zugabe der Liganden (0,1 nmol mM-CSF; 0,2 nmol hTSLP) bindet und eluiert der größte Teil der zugegebenen Proteinmenge, auch bei gleichzeitiger Inkubation mit der Sonde. Die Sonde wird bei der Inkubation spezifisch aus dem ZL isoliert und eluiert gemeinsam mit dem Rezeptor bzw. gemeinsam mit dem Rezeptor und dem Liganden. Die Bandenintensität an eluierter Sonde liegt deutlich unter der eingesetzten Menge TraO-TFP-TraO und somit auch deutlich unterhalb der Intensität, die für äquimolare Bindungsverhältnisse sprechen würde. Die Intensität beträgt etwa 20 % der für äquimolare Bindung zu erwartenden Intensität. Dieses Ergebnis entspricht in etwa den bisherigen zur Bindungsstärke dieser verkürzten, modifizierten TraN-Variante gegenüber TraO (3.2.2, 3.2.3).

### 3.4.2 Nachweis von immobilisierten Zytokinen mit TraN-markierten Rezeptoren und TraO-Fluoreszenzprotein-Hybriden per Durchflusszytometrie

Die TraO/TraN-Interaktion bietet die Möglichkeit lösliche TraN-Zytokinrezeptoren mit fluorochromen TraO-Sonden zu labeln (3.4.1). Im nächsten Schritt sollten die immobilisierten Liganden der Rezeptoren auf Oberflächen nachgewiesen werden. Dafür wurden Zytokine kovalent an eine NHS-aktivierte Matrix gekoppelt. Anschließend kann die Matrix mit dem entsprechenden Rezeptor und der Sonde inkubiert werden (Abbildung 40). Als lösliche Rezeptoren dienen die beiden in 3.4.1 hergestellten TraNshortNC-T21A-Varianten und als Sonde wurde das im gleichen Abschnitt erzeugte TraO-TFP-TraO-Fluoreszenzprotein verwendet.

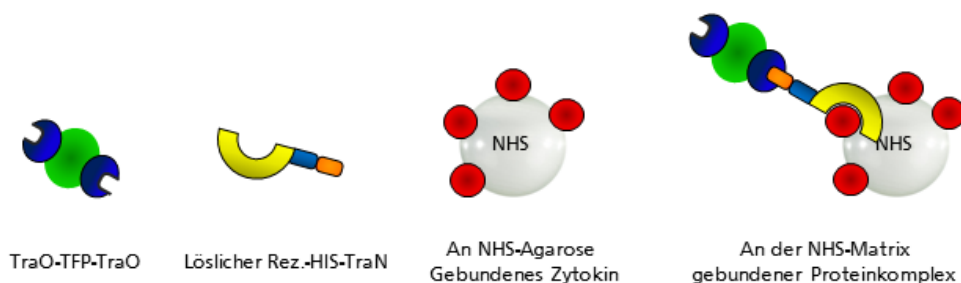


Abbildung 40: Schema des experimentellen Ablaufes der Detektion von immobilisierten Zytokinen auf Agarosematrix. Das Zytokin wird kovalent an die Matrix gebunden und mit dem löslichen Rezeptor-HIS-TraN Fusionsprotein und dem TraO-TFP-TraO inkubiert. Der Komplex bindet an die Matrix und kann im FACS analysiert werden.

Die Hitrap-Matrix wurde mit BSA, mM-CSF, hTSLP und den beiden löslichen Rezeptoren mc-FMSR-TraN bzw. hTSLPRa-TraN gekoppelt. Die mM-CSF- und die hTSLP-gekoppelte Matrix wurden mit mc-FMSR-TraN bzw. hTSLPRa-TraN inkubiert. Anschließend wurde TraO-TFP-TraO zugegeben und erneut inkubiert. Sowohl die mit BSA als auch die mit den löslichen Rezeptoren gekoppelte Matrix wurden als Kontrollen mitgeführt. Im Zytometer erfolgte die Fluoreszenzmessung der Matrix für FL1. Die Ergebnisse wurden im Histogramm verglichen (Abbildungen 41 und 42)

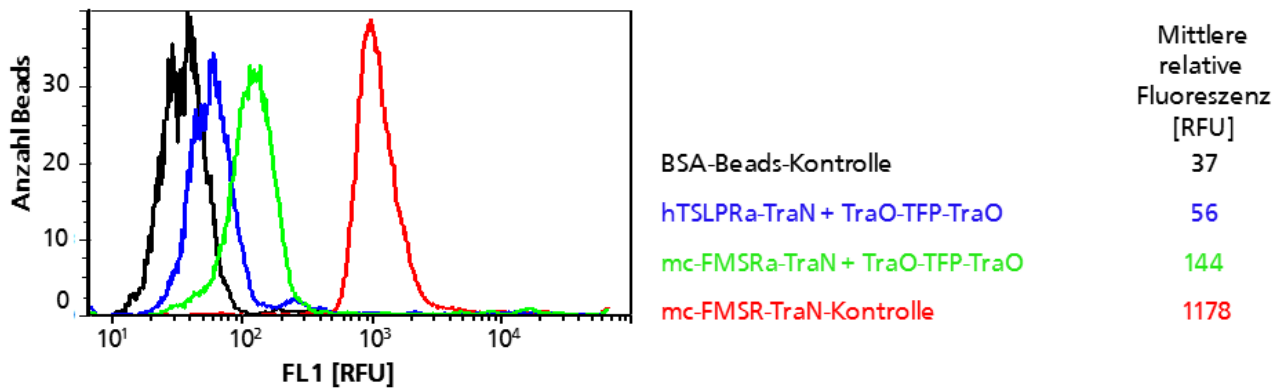


Abbildung 41: Histogramm der FACS-Analyse proteingekoppelter Agarose-Beads. An die NHS-Matrix wurden die Proteine BSA, hM-CSF und mc-FMSR-TraN kovalent gebunden. Die BSA-gekoppelte Matrix dient als Negativkontrolle und wurde nicht inkubiert (schwarz), die mc-FMSR-TraN-Matrix wurde mit TraO-TFP-TraO inkubiert und dient als Positivkontrolle (rot). Die mM-CSF-Matrix wurde nacheinander mit hTSLPRa-TraN und TraO-TFP-TraO (blau), sowie nacheinander mit mc-FMSR-TraN und TraO-TFP-TraO (grün) inkubiert.

Abbildung 41 zeigt das Histogramm der Fluoreszenzintensitäten der mM-CSF-gekoppelten Matrix. Wird diese mit dem nicht komplementären löslichen Rezeptor (hTSLPRa-TraN) und der TraO-TFP-TraO-Sonde inkubiert, so liegt die mittlere relative Fluoreszenz um etwa Faktor 1,5 höher als die der Negativkontrolle. Bei Inkubation mit dem zum immobilisierten Liganden passenden mc-FMSR-TraN-Rezeptor und der TraO-TFP-TraO-Sonde liegt die mittlere relative Fluoreszenz etwa Faktor 4 höher als die der Negativkontrolle. Das mit Abstand höchste Fluoreszenzsignal wurde erreicht, wenn der auf der Matrix immobilisierte mc-FMSR-TraN-Rezeptor mit der Sonde inkubiert wird.

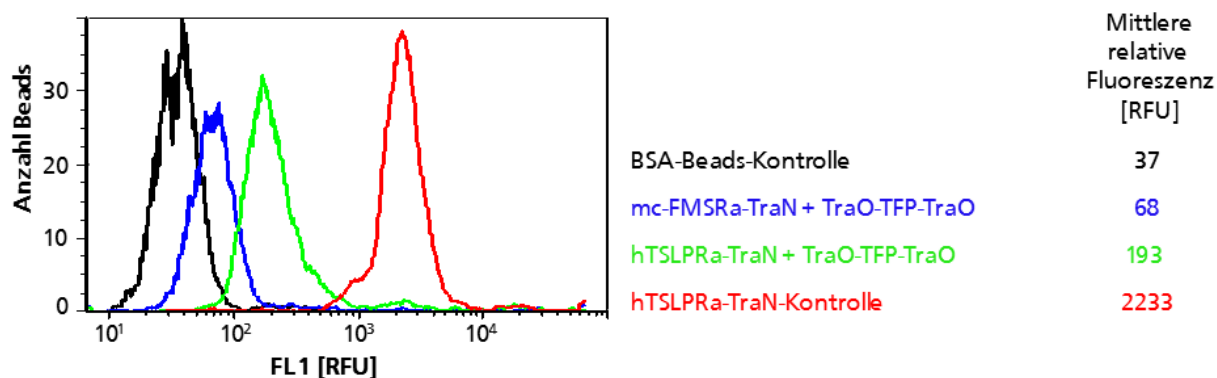


Abbildung 42: Histogramm der FACS-Analyse proteingekoppelter Agarose-Beads. An die NHS-Matrix wurden die Proteine BSA, hM-CSF und hTSLPRa-TraN kovalent gebunden. Die BSA-gekoppelte Matrix wurde nicht inkubiert (Negativkontrolle, schwarz), die hTSLPRa-TraN-gekoppelte Matrix wurde mit TraO-TFP-TraO inkubiert und dient als Positivkontrolle (rot). Die hTSLP-gekoppelte Matrix wurde mit mc-FMSR-TraN und TraO-TFP-TraO (blau) sowie mit hTSLPRa-TraN und TraO-TFP-TraO (grün) inkubiert.

Das Histogramm der Fluoreszenzintensitäten der hTSLP-gekoppelten Matrix in Abbildung 42 ist dem der mM-CSF-gekoppelten Agarose sehr ähnlich. Wird die hTSLP-Matrix mit dem nicht komplementären, löslichen mc-FMSR-TraN-Rezeptor und der TraO-TFP-TraO-Sonde inkubiert, so liegt die mittlere relative Fluoreszenz um etwa Faktor 2 höher als die der BSA-Kontrolle. Nach der Inkubation mit dem zum gekoppelten Liganden passenden hTSLPRa-TraN-Rezeptor und der Sonde liegt die mittlere relative Fluoreszenz etwa Faktor 5 höher als die Negativkontrolle. Wurde der auf der Festphase immobilisierte hTSLPRa-TraN-Rezeptor mit dem TraO-Fluoreszenzprotein-Hybrid inkubiert, konnte wieder das höchste Fluoreszenzsignal gemessen werden.

### 3.4.3 Nachweis von TraN-markierten Zelloberflächenproteinen per Durchflusszytometrie

Ein vielversprechender Ansatz zur Nutzung der TraO/TraN-Interaktion ist der Nachweis von Liganden auf Zelloberflächen mit Hilfe der TraN-fusionierten löslichen Rezeptoren, also die Übertragung des Versuchsaufbaus unter 3.4.2 von Agarose-Matrix auf Zellen. HEK293T-Zellen können im Allgemeinen mit Plasmiden transfiziert werden und dadurch extrazellulär membranständige Rezeptordomänen oder andere gewünschte Liganden exprimieren. Das Zytokin mM-CSF (und auch hTSLP) wurde deshalb in ein solches, vorhandenes pcDNA3.1(-)zeo-Plasmid kloniert, so dass es auf Zelloberflächen exprimiert wurde. Die Zellen wurden mit den Plasmiden transfiziert und können anschließend über geeignete Sonden im FACS oder der Fluoreszenzmikroskopie nachgewiesen werden.

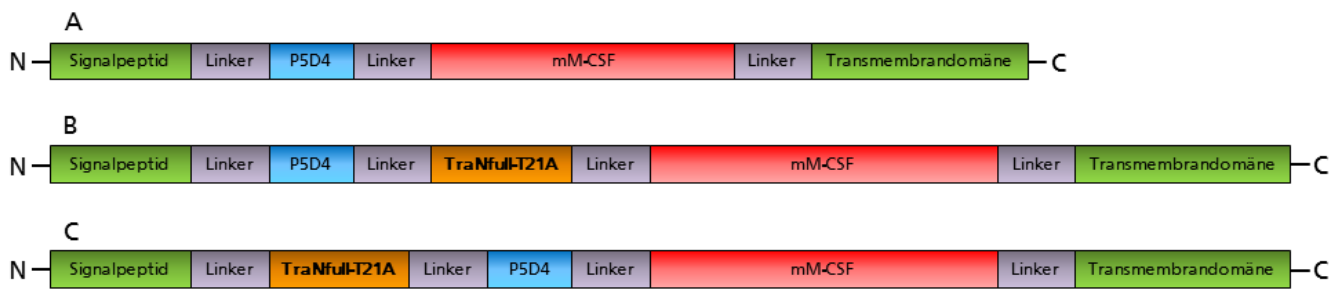


Abbildung 43: Schema der Proteinkonstrukte für die HEK-Oberflächenexpression nach Transfektion mit pcDNA-Plasmiden. Das ursprüngliche Konstrukt mit dem hIL-4Ra-Signalpeptid, dem P5D4-Epitoptag, der mM-CSF-Zytokinsequenz und der Transmembrandomäne (A). TraNfull-T21A wurde so inkloniert, dass es zwischen dem P5D4-Epitoptag und dem Zytokin (B) und N-terminal des P5D4-Epitoptag (C) exprimiert wird.

Als Vorlage diente der humane Interleukin-4-Rezeptor-alpha (hIL-4Ra), ein transmembraner Typ 1 Zytokinrezeptor [122]. Die mM-CSF-Sequenz wurde über PCR, präparative Restriktion und Ligation so in ein pcDNA3.1(-)zeo-Plasmid kloniert, dass aminoteminal die Sequenzen für das Signalpeptid des hIL-4Ra und eines P5D4-Epitoptags liegen. Carboxyterminal befindet sich eine Sequenz für die hIL-4Ra-Transmembrandomäne, welcher weitere 4 Aminosäuren der hIL-4Ra-zytoplasmatischen Domäne angefügt worden. Der schematische Aufbau des Fusionsproteins ist in Abbildung 43 dargestellt. Die Zelloberflächenexpression des resultierenden Konstruktes in HEK293T-Zellen konnte über den P5D4-Tag belegt werden. Jedoch ist die Markierung des Zytokins auf der Zelloberfläche durch den löslichen Rezeptor mit einem verkürzten TraN-Peptid und der TraO-Sonde nicht eindeutig (Daten nicht gezeigt). Um nachzuweisen, dass die TraO/TraN-Interaktion auch auf Zellen funktionsfähig ist, wurde die verwendete Kassette weiter modifiziert und die Sequenz für TraNfull-T21A zwischen P5D4-Epitoptag und Zytokin, sowie zwischen Signalpeptid und P5D4-Epitoptag kloniert (Abbildung 43). Dadurch konnte das TraNfull-T21A auf der Zelloberfläche angeboten und nachgewiesen werden.

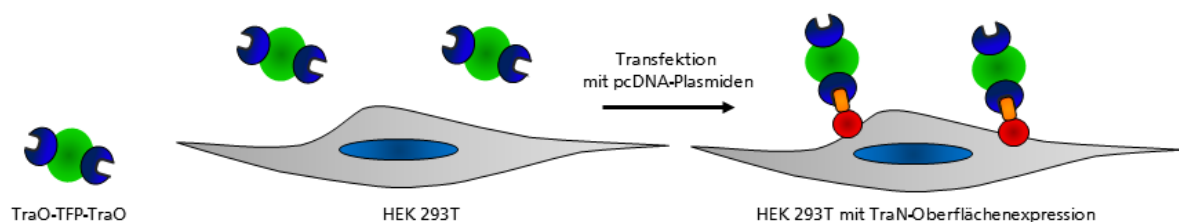


Abbildung 44: Schematischer Versuchsablauf für den Nachweis von TraN-Zelloberflächenproteinen auf HEK293T-Zellen. Diese werden mit den pcDNA-Konstrukten transfiziert und anschließend mit TraO-TFP-TraO inkubiert. Wird auf den Zelloberflächen das Markerprotein (TraNfull-T21A-Peptid bzw. P5D4-Epitoptag als Kontrolle) expositioniert, kann die Fluoreszenz der Zellen nachgewiesen werden.

Die HEK293T-Zellen wurden mit den resultierenden Plasmiden transfiziert. Den unterschiedlich transfizierten Zellen wurde chromatographisch aufgereinigtes TraO-TFP-TraO sowie parallel geklärtes, nicht

---

chromatographisch gereinigtes TraO-TFP-TraO-ZL zugegeben und inkubiert. Nach dem Waschen und der Resuspension wurde die Fluoreszenz der Zellsuspension im Durchflusszytometer überführt. Parallel wurde die Oberflächenexpression mittels primärem P5D4-Antikörper und sekundärem FITC-markierten Antikörper als Kontrolle durchgeführt. Die Ergebnisse der FACS-Analyse sind in Abbildung 45 dargestellt.



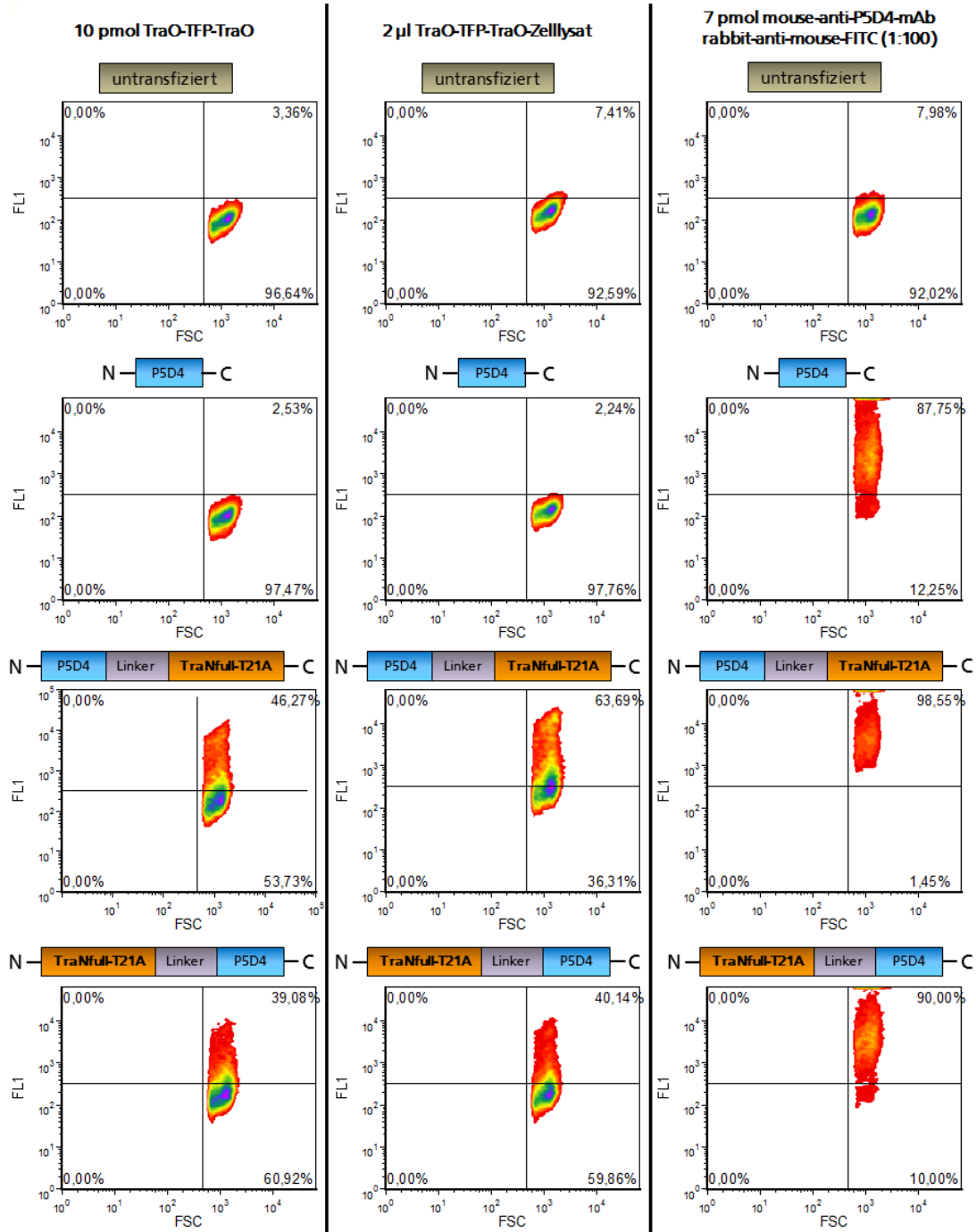


Abbildung 45: Density Blots der FACS-Analyse zum Nachweis von TraN auf HEK293T-Zellen unter Verwendung von TraO-TFP-TraO. Die unterschiedlich transfizierten HEK293T-Zellen wurden auf unterschiedliche Art fluoreszenzmarkiert. Die Auswertung erfolgt mit Hilfe von Quadrantenfeldern. Als Negativkontrolle dienen untransfizierte HEK293T-Zellen (1. Reihe). Die Zellen wurden mit drei Konstrukten (43) transfiziert, welche nur den P5D4-Epitoptag (2. Reihe), das TraNfull-T21A-Peptid zwischen P5D4-Epitoptag und Zytokin (3. Reihe) und TraNfull-T21A-Peptid N-terminal am P5D4-Epitoptag (4. Reihe) exprimieren. Die Zellen wurden inkubiert mit chromatographisch aufgereinigtem TraO-TFP-TraO (1. Spalte), und geklärten TraO-TFP-TraO-ZL (2. Spalte). Zur Expressionskontrolle wurden die Zellen mit anti-P5D4-mAb und anti-mouse-FITC inkubiert(3. Spalte).

---

Die Zytometrie-Daten in Abbildung 45 werden anhand von Quadrantenfeldern bzw. Gates ausgewertet. Die Fluoreszenzintensitäten der P5D4-markierten Zellen erhöhen sich bei allen transfizierten Zellen deutlich im Vergleich zu den untransfizierten Zellen, mehr als 80 % der Zellen befinden sich nach der Transfektion in dem Quadranten, der ein positives Signal darstellt. Wird mit Hilfe des TraO-TFP-TraO der TraN-Tag auf den Zellen nachgewiesen, so ändert sich die Fluoreszenz der Zellen ohne TraN nicht, exprimieren die Zellen TraN auf ihrer Oberfläche, so verschieben sich die Fluoreszenzintensitäten in den Quadranten, welcher ein positives Signal darstellt.

---

#### 3.4.4 Nachweis von TraN-getaggtten Zelloberflächenproteinen per Fluoreszenzmikroskopie

---

In eine 24-Well-Platte wurden Deckgläser gelegt und anschließend darauf HEK293T-Zellen ausgesät und mit den Plasmiden aus 3.4.3 transfiziert. Am Folgetag wurden die Zellen fixiert, mit 5 µl TraO-TFP-TraO-ZL inkubiert und fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen angefertigt.

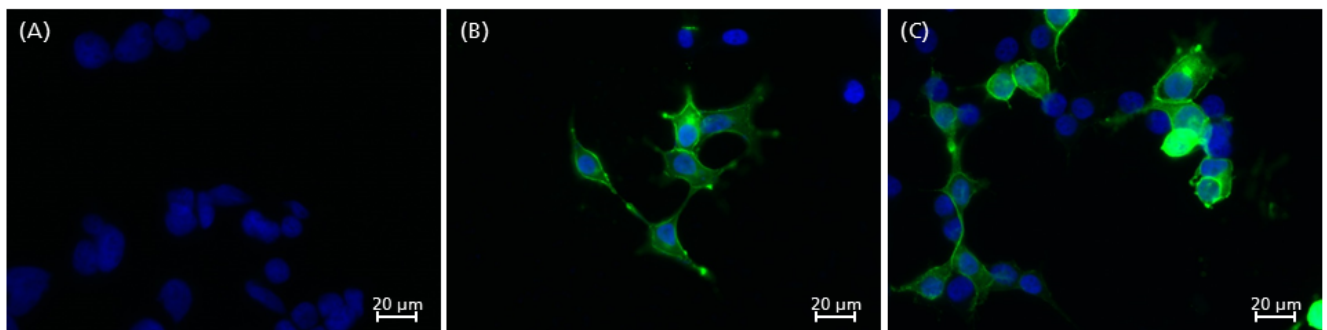


Abbildung 46: Fluoreszenzmikroskopie-Aufnahmen von HEK293T-Zellen. In untransfizierten Zellen sind lediglich die mit Dapi gefärbten Zellkerne sichtbar (A). Befindet sich auf der Oberfläche der Zellen das TraNfull-T21A-Peptid, so können diese mit dem geklärten TraO-TFP-TraO-ZL angefärbt werden. Dabei ist es auch hier unerheblich ob sich TraN zwischen P5D4-Epitoptag und Zytokin (B) oder N-terminal am P5D4-Epitoptag (C) befindet.

In Abbildung 46 ist deutlich zu erkennen, dass untransfizierte HEK293T-Zellen ausschließlich eine DAPI-Färbung aufweisen. Zellen, die TraN an ihrer Oberfläche tragen, konnten zum Großteil mit dem TraO-TFP-TraO-ZL angefärbt werden.

---

#### 3.4.5 Implementierung einer spezifischen Disulfidbrücken-Bildung innerhalb des TraO-TraN-Kopplungskonzeptes zur Herstellung kovalent verknüpfter Protein-Konjugate

---

Am Beispiel der Markierung TraN-markierter Proteine mit TraO-Fluoreszenzprotein-Konstrukten konnte bereits gezeigt werden, dass Proteine mit TraN- und TraO-Einheiten spezifisch miteinander konjugiert werden können. Um derartige Proteinkonjugate noch stabiler zu machen, wurde untersucht, ob durch das Einfügen von Cystein-Resten in Positionen von TraN und TraO, die sich in dem Molekülkomplex gegenüberliegen, eine gerichtete Disulfid-Verbrückung zwischen den beiden Bindepartnern erreicht werden kann. Auslösendes Moment dieser Überlegung war die Tatsache, dass in den Homologen VirB7/VirB9 des *A. tumefaciens* eine solche Anordnung von Cysteinen anzutreffen ist [104]. Analog zu den beschriebenen Positionen der Cysteinreste in VirB7 bzw. VirB9 wurden für TraO und TraN Expressionskonstrukte



Die Konstrukte pRSET-TraO-SQE-G95C und pRSET-TraNfull-P10C-TEV-GFP-HIS wurden in BL21(DE3) zur Expression gebracht und die resultierenden Cysteinvarianten chromatographisch gereinigt. Die gereinigten Proteine wurden zunächst per SDS-PAGE unter reduzierenden und nicht-reduzierenden Bedingungen analysiert. Es zeigte sich hierbei, dass sowohl bei TraO-SQE-G95C als auch bei TraNfull-P10C-TEV-GFP-HIS (TraNcys-GFP) eine durch die eingebrachten Thiolgruppen vermittelte partielle Homodimerisierung stattfindet (Abbildung 50, reduzierende (red.) und nicht reduzierende Probenansätze (n. red.)). Bei Ko-Inkubation von TraO-SQE-G95C und TraNcys-GFP zur Erzeugung kovalent verknüpfter Heterodimere wurde deshalb das Redoxmillieu durch Einbeziehung unterschiedlicher Konzentrationen an DTT variiert. Abbildung 50 zeigt die Ausbildung von TraO/TraN-Heterodimeren in Abhängigkeit der vorherrschenden DTT-Konzentration.

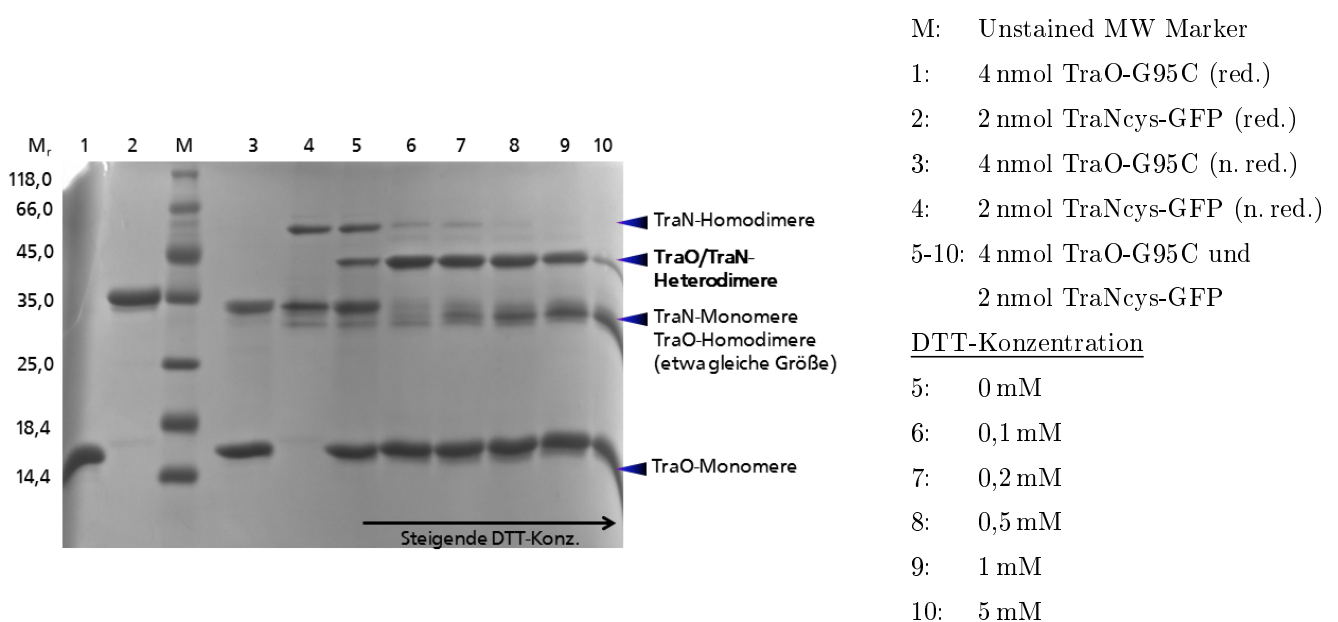


Abbildung 50: SDS-PAGE der Ko-Inkubation von TraO-SQE-G95C und TraNfull-P10C-TEV-GFP-HIS zur Erzeugung kovalent verknüpfter Heterodimere durch Einbeziehung unterschiedlicher Konzentrationen an DTT.

Abbildung 50 ist zu entnehmen, dass TraOcys und TraNcys in Abwesenheit von DTT nur teilweise Disulfid-verbrückte TraO-TraN-Heterodimere ausbilden konnten. Diese erscheinen als neue Proteinbande im Größenbereich von 45 kDa. Die in den nicht-reduzierten Ausgangsproben bereits nachweisbaren homodimeren Assoziate von TraOcys (ca. 30 kDa) und TraNcys (ca. 60 kDa) benötigen offenbar den Zusatz eines reduzierenden Agens, um die ausgebildeten Disulfidbrücken zu lösen und die stabilere Disulfidbrücke zwischen TraOcys und TraNcys auszubilden. Bei DTT Konzentrationen zwischen 0,1 mM und 0,5 mM ist zum überwiegenden Teil eine Verbrückung des vorhandenen TraNcys mit dem im molaren Überschuss vorliegenden TraOcys beobachten. Im Konzentrationsbereich zwischen 0,2 mM und 5 mM DTT ist eine graduelle Zunahme der Proteinbandenintensität im Größenbereich des TraNcys-Monomers

(30 kDa) zu beobachten, wobei im Reaktionsansatz mit 5 mM DTT kaum noch kovalent verbrückte Heterodimere nachweisbar sind.

### 3.4.6 Nachweis von TraN-Fusionsproteinen im Western Blot durch HRP-TraO-Konjugate

Die acht verschiedenen TraN-Varianten sowie ein chromatographisch aufgereinigtes Tag-freies GFP wurden in der SDS-PAGE aufgetrennt. Anschließend wurden die Proteine im Western Blot-Verfahren auf eine Nitrozellulosemembran übertragen und mit dem HRP-gekoppelten TraO-SQE schüttelnd inkubiert. Zur Detektion wurde die Membran mit ECL-Lösung beträufelt und abgeleuchtet.

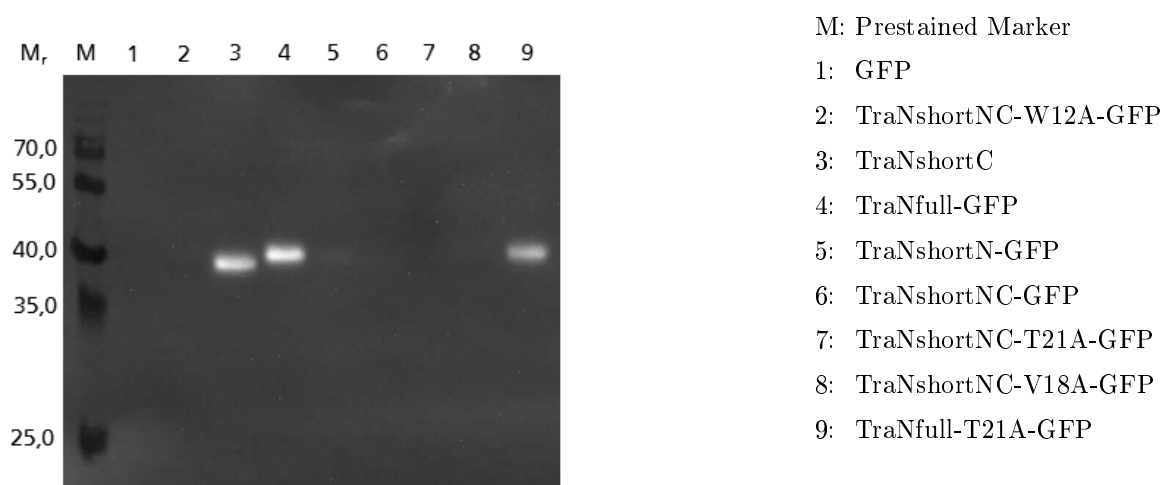


Abbildung 51: Western Blot zum Nachweis der acht verschiedenen TraN-Varianten (je 1 µg; 0,07 nmol) mit TraO-HRP.

Die Aufnahme des Western Blot in Abbildung 51 zeigt drei TraN-Fusionsproteine die klar detektierbar sind. Wie in den bisherigen Versuchen handelt es sich um die beiden TraN-Volllängenvarianten (TraNfull-GFP und TraNfull-T21A-GFP) und die C-terminal verkürzte TraN-Variante (TraNshortC-GFP). Eine ganz leichte Bande ist beim TraNshortN-GFP erkennbar. Alle anderen Fusionsproteine, wie auch die GFP-Kontrolle sind nicht detektierbar.

### 4.1 Herstellung und Optimierung der TraO-Derivate für die biotechnologische Anwendung

---

Voraussetzung für die Untersuchung der TraO/TraN-Interaktion war zunächst die rekombinante Herstellung der Interaktionspartner. Die Proteinbiosyntheserate von TraO-126 in *E. coli* ist außerordentlich hoch. Die Rückfaltung aus Inclusion Bodies ist einfach und kann ohne Zugabe von Faltungshilfen erfolgen. Aufgrund seiner Ladung kann TraO leicht und sehr spezifisch durch Kationenaustauschchromatographie angereichert werden. Auf diese Weise lassen sich reproduzierbar sehr hohe Reinheiten erzielen. TraO kann in großen Mengen produziert werden und ist für spätere Verwendungen nicht limitierend. Deshalb kann es als Teil eines disposable- bzw. single-use technology-Systems, welche an Bedeutung gewinnen, Verwendung finden [123] [124].

Wie in 1.2.1 beschrieben, ordnen sich mehrere TraO-Moleküle ringförmig in der äußeren Membran des Bakteriums an. Derartige Interaktionen können die Untersuchungen zur Interaktion zwischen TraO und TraN erschweren und sich negativ auf künftige Anwendungen auswirken. Zur Verhinderung der angenommenen Selbstassoziation bei dem hier verwendeten, verkürzten TraO-Derivat wurden drei Aminosäuren im C-terminalen Bereich ausgetauscht (TraO-SQE) oder der Carboxyterminus des TraO deletiert (TraOshort). In der wildtypischen Sequenz bzw. den vorhandenen Strukturmodellen des T4SS befinden sich diese Aminosäuren im Bereich einer möglichen Interaktion zweier benachbarter TraO-Moleküle nahe des Carboxyterminus. In räumlicher Nähe des Glycin272 befinden sich im benachbarten TraO-Molekül die Aminosäuren Valin198 und Histidin199, in der Nähe von Alanin275 sind im anliegenden TraO-Molekül die Seitenketten von Phenylalanin211, Prolin212 und Alanin213. Zwischen den genannten Seitenketten der benachbarten Proteine kommt es wahrscheinlich zur Ausbildung von Van-der-Waals-Wechselwirkungen zwischen den unpolaren Aminosäuren. Um eine Interaktion zu verringern, wurden jeweils kleinere unpolare bzw. ungeladene gegen größere polare bzw. geladene Seitenketten getauscht. Unpolare Seitenketten liegen häufig in inneren, hydrophoben Bereichen von Proteinen bzw. Proteinkomplexen [95]. Die ebenfalls im Bereich einer TraO-TraO-Interaktion liegende Aminosäure Alanin277 liegt in räumlicher Nähe zu Glutaminsäure239 des benachbarten TraO, der Austausch zu Glutaminsäure soll eine Abstoßung der beiden negativ geladenen Seitenketten bewirken. Die eingefügten Punktmutationen in TraO-SQE verringern die Selbstassoziation von TraO, indem sie durch veränderte Größe, Polarität und Ladung der Seitenketten eine Dimerisierung bzw. Multimerisierung des Proteins minimieren. In der Größenausschlusschromatographie zeigt TraO-SQE eine leicht geringere Dimerisierungsneigung im Vergleich zu TraO-126. Dies unterstreicht die Hypothese der Selbstassoziation, welche die Charakterisierung der TraO/TraN-Bindungseigenschaften in anderen Versuchen erschwert. Bei der Nutzung von TraO zur Affinitätschromatographie besteht die Möglichkeit, dass kovalent an die Matrix gebundene TraO-Moleküle mit anderen TraO-Molekülen assoziieren und die Ergebnisse verfälschen. Wird TraO als Fluoreszenzsonde verwendet kann es zur Ergebnisverfälschung infolge einer unspezifischen Signalakkumulation kommen. Die Modifizierung des TraO-Moleküls mit der C-terminalen Verkürzung des Proteins hat einen negativen Einfluss auf die genannten günstigen Rückfaltungs- und Reinigungseigenschaften. Das zur Verringerung der Selbstassoziation erzeugte TraOshort-Protein präzipitiert und die Ergebnisse der SDS-PAGE deuten auf einen schnelleren proteolytischen Abbau als bei den anderen TraO-Varianten hin [125]. Durch die Deletion der Aminosäuren ändern sich die physikalisch-chemischen Eigenschaften des Proteins. Die

---

außenliegenden Seitenketten sind andere und es kommt zur Veränderung von Polarität an der Proteinoberfläche und somit auch seiner Löslichkeit [126]. Auch im deletierten carboxyterminalen Bereich sind einige funktionelle Gruppen hochkonserviert [104], was für einen wesentlichen Beitrag dieses Bereichs zur strukturellen Integrität des Proteins spricht und somit zu seiner Stabilität und Funktion beiträgt [127] [128] [129]. Das in der Größenausschlusschromatographie als Referenz verwendete cysteinhaltige TraO-S7C war eine der ersten produzierten TraO-Varianten. Die Thiolgruppe sollte bzw. kann dazu genutzt werden, TraO kovalent an ein anderes Molekül, z. B. eine Festphase oder ein synthetisches Fluorophor zu binden [130] [131]. Durch die ortsspezifische Bindung an reaktive Gruppen wie Maleimid, Pyridyldisulfid oder Vinylsulfon mit dem im aminoterminalen Bereich von TraO liegenden Cystein ließe sich eine orientierte Immobilisierung und somit eine weitaus homogenere Anordnung an der Oberfläche erreichen [132] [133]. Eine Kopplung von TraO an eine Festphase über Cystein wurde bisher nicht untersucht. Stattdessen wurde TraO über primäre Aminogruppen von Lysinen kovalent an eine N-Hydroxysuccinimid-Ester-aktivierte Agarosematrix gebunden [131]. Da TraO insgesamt sieben Lysine besitzt, kann zu einer ungerichteten Orientierung des Liganden kommen. Es entsteht eine heterogene Matrix, die partielle Aktivität oder sterische Hinderungen aufweisen kann [134]. Für das Ziel der Charakterisierung der TraO/TraN-Interaktion mit der zur Verfügung stehenden Festphase wurde mit TraO-SQE die optimale Variante für alle weiteren Versuche ermittelt. Die funktionelle Überprüfung der rekombinant erzeugten TraO-126 und TraO-SQE zeigt, dass ein Großteil beider hergestellten Proteine in der Lage ist, an das TraN-Volllängenkonstrukt zu binden und somit biologische Aktivität aufweist. In den durchgeführten Versuchen verhalten sich TraO-126 und TraO-SQE in ihrer Affinität gegenüber allen TraN-Derivaten nahezu ähnlich. Aufgrund der bereits erwähnten verringerten Dimerisierungsrate wurde im weiteren Verlauf der Arbeit TraO-SQE verwendet. Die günstigen Expressions- und Aufreinigungseigenschaften bleiben mit TraO-SQE erhalten.

---

## 4.2 Herstellung und Optimierung der TraN-Bindedomänen für die biotechnologische Anwendung

---

Acht verschiedene TraN-GFP-Fusionsproteine wurden rekombinant hergestellt, um ihre Affinitäten zu TraO zu untersuchen. Alle erzeugten TraN-Varianten lassen sich in *E. coli* exprimieren und aus dem Zelllysats isolieren. Die verschiedenen Derivate unterscheiden sich in ihren Expressions- und Reinigungseigenschaften kaum. Die Proteine lassen sich in ausreichender Menge über das carboxyterminal eingeführte Polyhistidin spezifisch anreichern. In zwei Versuchsanordnungen wurden die Affinitäten der verschiedenen TraN-Fusionsproteine zu TraO untersucht. Zum einen wurden die Derivate über das eingebrachte Polyhistidin an einer Matrix immobilisiert, anschließend mit TraO inkubiert und die Proteinmengen nach gemeinsamer Elution densitometrisch ermittelt. Zweitens wurde TraO kovalent an eine Festphase gebunden, mit den verschiedenen TraN-GFP-Varianten inkubiert und die Bindungsintensitäten aus den Fluoreszenzwerten der Lösungen errechnet. Die beiden eingesetzten Methoden zur Validierung der Bindungseigenschaften können fehlerbehaftet sein. Die densitometrische Auswertung von SDS-Gelen zeigt bei der Erstellung von Eichgeraden hohe Standardabweichungen. Die Berechnungen wurden nach manueller Zuordnung der Spuren und Banden im Gel vorgenommen. Besonders bei niedrigen Intensitäten schwanken die Messwerte. In höheren TraO-Konzentration wurden teilweise molare TraO/TraN-Verhältnisse von größer 1 ermittelt. Dies könnte einerseits in der angesprochenen Varianz der quantitativen Auswertung begründet sein. Andererseits kann dieses Ergebnis auch aus der Bindung homodimerer Assoziate des

TraO, wie sie eingangs beschreiben wurden, hervorgehen. Eine unspezifische Bindung von TraO an die Ni-NTA ist unwahrscheinlich, aber nicht ausgeschlossen. Die Nutzung professioneller Auswertungssoftware für die Densitometrie oder die Quantifizierung der Proteinlösungen durch Kapillarelektrophorese können zuverlässige Ergebnisse liefern [135] [136]. Beide Methoden kommen dennoch zu sehr ähnlichen Ergebnissen. Die besten Bindungseigenschaften besitzt das TraN-Volllängenkonstrukt, die C-terminale Verkürzung zeigt in etwa identische Bindungseigenschaften. Die aminoterminal TraN-Verkürzung hat indes eine erhebliche Verringerung der Affinität zu TraO zur Folge. Wird dieses N-terminal verkürzte TraN-Derivat zusätzlich C-terminal verkürzt, bleibt die Affinität dieser beiden Varianten zu TraO in etwa gleich. Folglich spielt der C-terminale Anteil des TraN-Konstruktes (AS 24-33) für die Bindung zu TraO keine entscheidende Rolle, obwohl im Strukturmodell die Aminosäuren von TraN im Bereich von AS 24-28 stark von TraO-Seitenketten umgeben werden [87]. In der Literatur ist in diesem Bereich ebenfalls keine Wechselwirkung beschrieben. Die TraO-Seitenketten in räumlicher Nähe befinden sich vor dem ersten  $\beta$ -Faltblatt (Glutamin173, Threonin174 und Phenylalanin176) und zwischen  $\beta 6$  und  $\beta 7$  (Glutaminsäure239 und Asparagin240) [104]. Ausgeprägte Wechselwirkungen finden jedoch oft vermehrt im Bereich von geordneten Proteinstrukturen statt, so offenbar auch in TraO [137]. Alle aminoterminal verkürzten TraN-Varianten binden erheblich schwächer an TraO. Die erste beschriebene Interaktion zwischen TraO und TraN befindet sich erst carboxyterminal der vorgenommenen Verkürzung an Position 8. Auch die vorhandenen Strukturmodelle aus der Kernspinresonanzspektroskopie und der Elektronenmikroskopie sprechen gegen eine Interaktion vor Position 8, einer Prolin-Seitenkette [103] [87]. Möglicherweise sind die aminoterminalen Aminosäuren (AS 2-7) für die strukturelle Anordnung der darauf folgenden Seitenketten verantwortlich. Sie könnten zum Beispiel zur Stabilisierung der für die Bindung benötigten Konformation beitragen oder das TraN-Peptidsegment für die Bindung an TraO zugänglich halten. Besonders die beiden Proline an Position 6 und 7 können die nachfolgende Struktur beeinflussen. Prolinreiche Regionen haben oft die Zusatzfunktion eines strukturellen Elementes [138]. Die Prolin-Seitenkette ist die einzige, die mit dem Peptidrückgrat zweifach verbunden ist. Dadurch ist die Rückgratkonformation im Gegensatz zu den anderen Aminosäuren beeinträchtigt und die Sperrigkeit der N-CH<sub>2</sub>-Gruppe verursacht Einschränkungen in der vorhergehenden Aminosäure [139]. Die eingenommene Konformation wird wesentlich durch die vorangegangene Seitenkette bestimmt [140], aber auch weitere N-terminal liegende Seitenketten beeinflussen die räumliche Struktur [141]. Prolin ist häufig in engen Kehren oder auf Proteinoberflächen vorzufinden und gilt als "Helixbrecher" [142]. Die relative Häufigkeit von Prolin in  $\alpha$ -Helices und  $\beta$ -Faltblättern ist die niedrigste aller Aminosäuren, dagegen kommt diese Seitenkette in Kehren am häufigsten vor [95]. Obwohl Prolin die Eigenschaft hat,  $\alpha$ -Helices und  $\beta$ -Faltblätter zu unterbrechen, verleiht es an anderer Stelle eine extreme Festigkeit und eine besondere Struktur in interagierenden Proteinen [138]. Bestes Beispiel sind Kollagene, Tripelhelixproteine mit hoher Festigkeit, welche einen extrem hohen Prolinanteil mit dem häufig wiederholenden Sequenzmotiv "G-P-P" besitzen. Oft - wie auch im Falle von TraN - sind solche prolinreichen Regionen konserviert [143] [144]. Zusammenfassend konnte nachgewiesen werden, dass für die Interaktion mit TraO der N-terminale Bereich des TraN bedeutend ist. In weiterführenden Experimenten könnte durch Aminosäure-Austausch-Varianten der Einfluss der Proline auf die Bindung des TraN an TraO näher untersucht werden. Neben den Verkürzungen des Bindemotivs wurden TraN-Mutagenesestudien durchgeführt, um die Bindungseigenschaften zu charakterisieren bzw. das Peptid für die biotechnologische Nutzung zu optimieren. Oft ist



---

es bei der Herstellung und Reinigung rekombinanter Proteine nötig, den Fusionspartner vom Zielprotein zu entfernen. Für eine proteolytische Spaltung müssen die jeweiligen Erkennungsmotive in das Protein eingebracht werden. Es konnte gezeigt werden, dass das TraN-Volllängenkonstrukt eine unspezifische Faktor Xa-Proteasespaltstelle besitzt. Das Faktor Xa-Erkennungsmotiv ist "I-E-G-R", ein in Proteinsequenzen seltenes Motiv, mit der carboxyterminalen Spaltung nach Arginin [145] [146]. Ähnliche Motive, bei denen es zur unspezifischen Hydrolyse der Peptidbindung durch Faktor Xa nach Arginin kommt, sind beschrieben [147] und die in TraNfull vorkommende Sequenzfolge "G-R" ist als mögliches Motiv für kompetitive Faktor Xa-Inhibitoren beschrieben [148]. Es wurde deshalb angenommen, dass die unspezifische Proteolyse carboxyterminal von Arginin an Position 30 des TraNfull stattfindet. Einen konkreten experimentellen Hinweis hierzu liefert die TraNshortC-Variante, welche bei Inkubation mit Faktor Xa nicht gespalten wird. Sofern für die Weiterverwendung des Zielproteins das TraN-Peptid proteolytisch abgespalten werden muss, sollte dies entweder unter Verwendung einer C-terminal verkürzten TraN-Variante oder mit einer alternativen Protease geschehen. Für eine Nutzung von TraN als Affinitätstag ist eine weitere Untersuchung der unspezifischen Spaltung durch verschiedene prominente Proteasen nötig. Zwar kann eine Sequenz durch diverse Programme auf Proteasespaltstellen untersucht werden, aber im Falle von TraNfull und Faktor Xa lässt sich damit keine unspezifische Spaltung vorhersagen [149]. Eine Auswahl der Enzyme sollte deshalb im Modellexperiment bewertet werden. Beispiele sind hier die Enterokinase und das Thrombin [150] [147]. Für die TEV-Protease konnte keine sekundäre Spaltstelle in TraN identifiziert werden. Obwohl die TEV-Protease im Gegensatz zu den anderen genannten Proteasen mit vergleichsweise geringem Aufwand und in großer Menge rekombinant in *EE.coli* herstellbar und über das fusionierte Polyhistidin in der immobilisierten Metallionen Affinitätschromatographie zu reinigen ist [151], findet sie bisher in unserem Labor keine Verwendung. Grund dafür ist die oft angegebene Erkennungssequenz mit Glycin oder Serin an Position P1' [152]. Allerdings wurde mehrfach gezeigt, dass fast alle Aminosäuren (außer Prolin) an P1' zur Proteolyse durch TEV führen [153] [154] [155]. Einige der rekombinant herzustellenden Faktoren sollten entsprechend mit TEV-Proteasespaltstelle kloniert, exprimiert und aufgereinigt werden.

Auch alle anderen im TraN-Peptid vorgenommenen Mutationen haben einen negativen Einfluss auf seine Affinität zu TraO. Tauscht man das Tryptophan an Position 12 gegen Alanin, so findet fast keine Interaktion zwischen TraO und TraN statt. Es wurde beschrieben, dass Tryptophan den Raum zwischen Glycin<sub>263</sub>, Arginin<sub>265</sub> und Valin<sub>185</sub> (TraO<sub>CT</sub>) füllt [104], eine elektrostatische Wechselwirkung zwischen dem  $\pi$ -Elektron im Tryptophan und der Guanidinogruppe des Arginin ist nicht beschrieben, aber wahrscheinlich [156]. Tryptophan ist die einzige Aminosäure mit Indol-Ringsystem, einem aromatischen Heterozyklus mit Stickstoffatom. Es besitzt also die größte Seitenkette und ist gleichzeitig die seltenste Aminosäure [157]. Tryptophanaustausche im Protein sind deshalb für dessen Interaktion mit anderen Makromolekülen oft folgeschwer [142]. Tryptophan kommt vermehrt an Oberflächen vor, die mit anderen Proteinen interagieren [158]. So ist beispielsweise seine Rolle in der Verankerung von Membranproteinen beschrieben [159]. Im Strep-Tag führt die Mutagenese einzelner Tryptophanreste in der Bindungsstelle von Streptavidin in jedem Fall zu einer signifikanten Verschlechterung seiner Bindung an Biotin [160]. Auch der Einfluss von Tryptophan auf die Tertiärstruktur von Proteinen wurde beschrieben [161]. Die Ergebnisse legen nahe, wie essentiell die Seitenkette an dieser Stelle für die TraO/TraN-Interaktion ist, eine Überprüfung mit einem volllängen TraN mit Tryptophanaustausch ist dafür allerdings nötig.

Das konservierte "P-V-N-K"-Motiv, welches in der hydrophoben Tasche zwischen zwei  $\beta$ -Faltblättern des TraO liegt [104], scheint ein Ansatzpunkt für Modifikationen oder Konkurrenz zu sein. Es wurde demonstriert, dass eine ortsgerichtete Mutagenese und der Austausch von Valin gegen Alanin an Position 18 in einer stark verminderten Affinität des TraN-Peptids zu TraO resultiert, was die Vermutung der hydrophoben Tasche an dieser Stelle bestätigt. Valin besitzt eine hydrophobe Seitenkette, welche sich bevorzugt in hydrophoben Regionen von Proteinen oder Proteinkomplexen befindet [142]. Die Alaninseitenkette hingegen ist etwas hydrophiler und deutlich kleiner. Interessant wären Austausche von Valin gegen Seitenketten mit ähnlicher Struktur und Charakteristik, wie Leucin oder Isoleucin [142], so wie sie in einigen Homologen von TraN vorkommen [104]. Dadurch kann entweder die Bindung für bestimmte Anwendungen weiter verstärkt werden oder eine Elution mit einem alternativen Puffer ohne Isopropanol oder Arginin erreicht werden. Die nachgewiesene schlechtere Bindung beim Austausch zu Alanin verdeutlicht die Wichtigkeit dieser Seitenkette und des "P-V-N-K"-Motivs, welche somit einen Ansatzpunkt für die Entwicklung eines Elutionspuffers bietet. Obwohl die beiden genannten Aminosäureaustausche nur am beidseitig verkürzten Peptid untersucht wurden, ist davon auszugehen, dass sie auch die Affinität zwischen dem TraN-Volllängenkonstrukt und TraO signifikant herabsetzen würden. Diese Austauschvarianten sind daher für biotechnologische Anwendungen weniger geeignet, die Ergebnisse geben jedoch Aufschluss über zwei relevante Aminosäuren der Interaktion. Der Austausch von Threonin zu Alanin an Position 21 hat ebenfalls einen negativen Einfluss auf die Stärke der TraO/TraN-Interaktion. Das gilt sowohl für die TraN-Volllängenvariante, als auch das beidseitig verkürzte TraN-Konstrukt und bestätigt wiederum die Abschwächung der Affinität von TraN zu TraO durch Verkürzung. Die Affinität von TraNshortNC-T21A-GFP zu TraO ist jedoch höher als die der beiden bisher beschriebenen Mutanten. Der Austausch dieser funktionellen Gruppe hat den geringsten Einfluss auf die untersuchte Interaktion. Grund der Mutagenese war die Entfernung einer möglichen N-Glykosylierungsstelle, damit das TraO/TraN-System künftig auch an eukaryotischen Proteinen eingesetzt werden kann. Durch N-Glykosylierung werden Oligosaccharid-Ketten an die Aminogruppe von Asparagin innerhalb des Erkennungsmotivs "N-X-S/T" [162] angehängt. Da das betroffene Asparagin an Position 19 innerhalb des konservierten Bindemotivs "P-V-N-K" liegt, ist es wahrscheinlich, dass sich die posttranslationale Modifikation negativ auf das Bindeverhalten gegenüber TraO auswirkt. Durch einen Austausch des Threonins an Position 21 zu Alanin konnte der für die Wechselwirkung kritische Bereich unverändert bleiben und gleichzeitig dessen Glykosylierung ausgeschlossen werden. Bei der Nutzung der TraO-Agarosematrix bindet TraNfull-T21A-GFP in etwa genau so gut wie das wildtypische Volllängenkonstrukt. In der Versuchsanordnung mit Ni-NTA-Agarose zeigt das TraN-Derivat ohne die potentielle posttranslationale Modifikation eine verminderte Interaktion mit TraO. Dies kann durch die Anordnung und sterische Hinderung auf den Matrices oder durch die starken Schwankungen der Messwerte in der densitometrischen Analyse zustande kommen. Die Affinität ist aber stärker als die aller aminoterminal verkürzten, sowie die alle anderen mutierten TraN-Varianten. Es sollte überprüft werden, ob an den Asparaginseitenketten des TraN an dieser Position im eukaryontischen System eine Glykosylierung stattfindet. Zu diesem Zwecke wurden TraN-fusionierte Rezeptorkonstrukte mit und ohne Glykosylierungsstelle kloniert, konnten aber bisher noch nicht zur Expression gebracht werden.

Eine Messung der Assoziations- und Dissoziationskonstanten ist erforderlich. Dafür müssen im Gleichgewicht die Konzentrationen von Ligand, Analyt und Komplex ermittelt werden [163]. Die Ergebnisse

---

legen die Vermutung nahe, dass bei den Bindungspartnern mit hoher Affinität, abhängig von der Methode, die Konzentration an freiem Ligand oder Analyt gegen Null strebt. Die Quantifizierung derartig geringer Proteinmengen ist mit den gegebenen Methoden nicht möglich. Alle Proben wurden deshalb für die Bestimmung der Konstanten in der Bio-Layer-Interferometrie vorbereitet.

---

### 4.3 Elution

---

Die Elution von TraN-Fusionsproteinen von der TraO-Matrix mittels verschiedener Puffer knüpft an die Evaluierung des Bindeverhaltens der verschiedenen TraN-GFP-Fusionsproteine an. Die in Tabelle 12 dargestellten Fluoreszenzintensitäten geben jeweils die Menge an eluiertem Protein nach der Bindung an die TraO-Matrix (3.2.3) wieder. Binden die Fluoreszenzproteine schwächer an die Matrix, so ist auch die Fluoreszenzintensität der Elution geringer. Deshalb wurden die prozentualen Anteile an eluiertem TraN-Fusionsprotein aus den Differenzen der gebundenen zu den eluierten Fluoreszenzintensitäten errechnet. Salz- bzw. detergenzhaltige Puffer lösen die Fluoreszenzproteine während der Inkubationszeit in geringem Maße von der TraO-Matrix. Durch NaCl entsteht um die Ionen eine Hydrathülle, was die elektrostatischen Wechselwirkungen in einer Lösung beeinflusst, wodurch es zur Dissoziation kommen kann [164] [165] [166]. PBS-T ist eine Detergenzien-haltige phosphatgepufferte Salzlösung, die standardmäßig beim Waschen von ELISA [167] und Western Blot [168] [169] eingesetzt wird, um unspezifische Bindungen zu reduzieren. Beide TraN-Volllängenkonstrukte und das C-terminal verkürzte TraN lassen sich mit NaCl und PBS-T nicht eluieren. Die TraN-Varianten mit Aminosäureaustauschen lösen sich mit diesen beiden Puffern mit der Zeit von der TraO-Matrix, da sie offenbar weniger affin sind. Bei der TraN-Minimalvariante ohne Glykosylierungsstelle findet sich nochmals mehr Fusionsprotein im Überstand und die Valin-Austauschvariante wird komplett von der Matrix gelöst. Die Elutionsergebnisse dieser beiden Puffer stimmen mit den bisher gemachten Beobachtungen zur Bindung überein. D.h. das Volllängenkonstrukt ohne Glykosylierung und das C-terminal verkürzte TraN werden durch NaCl und PBS-T kaum von der Matrix gewaschen, alle anderen TraN-Varianten lösen sich stärker von der Matrix, in vergleichbarer Folge zu ihrer zuvor ermittelten Bindungsstärke. Auch die Elution mit Arginin/Valin-Puffer und TraN-Peptid bestätigen die bisherigen Ergebnisse zu den Affinitäten der verschiedenen TraN-Varianten zu TraO. Wieder lassen sich das TraN-Volllängenkonstrukt und das C-terminal verkürzte TraN-GFP kaum lösen, das TraN-Volllängenkonstrukt ohne Glykosylierungsstelle nur wenig mehr und ein deutlicher Anteil aller N-terminal verkürzten TraN-Konstrukte wird in beiden Puffern von TraO gelöst. Somit eluiert dieser Puffer die in den bisherigen Versuchen am schwächsten bindenden TraN-Varianten nicht vollständig, aber am effektivsten. Die stärksten Binder werden hingegen kaum gelöst. Dass ein synthetisches TraN-Peptid der Minimalvariante kaum in der Lage ist die stärker bindenden TraN-Fusionsproteine (TraNfull-GFP und TraNshortC-GFP) zu lösen erscheint logisch, da es wegen des fehlenden N-terminalen Peptidabschnitts eine deutlich verringerte Bindung an TraO aufweisen sollte. Auch werden nur etwa die Hälfte der verkürzten, weniger stark bindenden Fusionsproteine durch das Peptid vom TraO verdrängt. Das Peptid wurde im Überschuss zugegeben, doch offenbar ist die Inkubationszeit zum Lösen der Moleküle nicht ausreichend. Die Verwendung eines synthetischen TraN-Volllängenpeptides zur Verdrängung des Fusionsproteins von der Matrix würde wahrscheinlich die Ergebnisse verbessern, doch die Herstellung des Peptides ist kostspielig und somit für die Elution ohnehin unpraktikabel. Wie bereits beschrieben ist Valin am Position 18 ein Ansatzpunkt für die Elution, da sein Austausch in einer deutlich schwäche-

---

ren Bindung resultiert. Der Arginin/Valin-Puffer ist in der Lage, einen Teil aller TraN-Varianten von der stationären Phase zu entfernen. Die Verwendung von Arginin / 2-Propanol-Puffer als Elutionsmittel führt bei allen TraN-Varianten zur Elution von der TraO-Matrix. Die unpolare Isopropyl-Gruppe ist in der Lage, intramolekulare hydrophobe Wechselwirkungen im Protein zu beeinträchtigen und kann offenbar erfolgreich Valin mit seiner Isopropyl-Gruppe verdrängen. Durch 2-Propanol wird die Polarität der Lösung herabgesetzt und somit das wässrige Milieu, in welchem Proteine natürlich vorkommen, verändert. Die biologische Aktivität und die Löslichkeit des Proteins können durch die Zugabe organischer Lösungsmittel negativ beeinflusst werden [170] [171] [172]. Allerdings beeinflussen viele Faktoren die Löslichkeit und die Aktivität von Proteinen, z.B. das Protein und das Lösungsmittel an sich, was generelle Aussagen nicht möglich macht. Die freie Aminosäure Arginin, welche den beiden letztgenannten Puffern zugesetzt wurde, kann Proteinaggregation während der Rückfaltung von Proteinen verhindern [173] [174] [175] und hat auch in unserem Labor mehrfach aggregationshemmende Wirkung gezeigt. Freies Arginin kann mit den meisten Aminosäureseitenketten interagieren und dadurch die Bildung von Proteinaggregaten in wässriger Lösung verhindern [176] [177]. Die durchweg geringen Fluoreszenzintensitäten nach der Inkubation mit Glycin sind auf den Verlust der GFP-Fluoreszenz im sauren Milieu (pH 3,0) zurückzuführen, welcher beschrieben ist [178] [179] und im Vorversuch bestätigt werden konnte. Eine Evaluierung dieses Elutionspuffers konnte dadurch in der verwendeten Versuchsanordnung nicht durchgeführt werden. Jedoch zeigt die Zerstörung der fluorophoren Gruppe des GFP die begrenzte Verwendbarkeit des Glycin-Puffers als universell einsetzbares Eluent zur funktionserhaltenden Rückgewinnung gebundener Proteine. Insgesamt lässt sich festhalten, dass mit dem kombinierten Einsatz von Arginin und Isopropanol eine nahezu vollständige Elution der TraN-GFP-Fusion als Modellprotein erreicht werden kann, wobei die Funktionalität des GFP vollständig erhalten bleibt. Dieser Befund stellt eine Verwendbarkeit des untersuchten Systems zur Affinitätschromatographischen Anreicherung in Aussicht. Weitere Faktoren, die eine Protein-Protein-Interaktion beeinflussen können, könnten validiert werden. Der pH-Wert, ein TraN-Volllängenpeptid, weitere (chaotrope) Salze der Hofmeister-Reihe [180] und andere Substanzen mit Propylgruppen können in Elutionspuffern untersucht werden um die beobachtete Präzipitation oder einen möglichen Aktivitätsverlust bei der Aufreinigung von Zytokinen zu verhindern. Die nachfolgenden Aufreinigungsversuche von Zytokinen wurden auf Grund der Ergebnisse mit dem Arginin / 2-Propanol-Pufferansatz durchgeführt.

---

#### 4.4 TraN zur affinitätschromatographischen Reinigung rekombinanter Zytokine aus *E. coli*

---

Um die TraO-Affinitätsmatrix für die Aufreinigung von TraN-Fusionsproteinen zu nutzen, wurde deren Isolierung aus komplexen Proteingemischen untersucht. Im Modellversuch wurde zunächst gezeigt, dass das Zielprotein TraNfull-GFP nahezu vollständig und äußerst spezifisch aus einem *E. coli*-Zelllysate an die Affinitätsmatrix bindet. Es ist zu berücksichtigen, dass in diesem Versuch das TraN-Fusionsprotein nicht eluiert wurde, sondern lediglich das auf der Festphase gebundene Protein analysiert wird. Im Zelllysate verbleibt kein Zielprotein bzw. ein eventuell vorhandener Rest ist in der Masse der anderen Proteine in der SDS-PAGE nicht erkennbar. Andere Proteine binden kaum an die Matrix, aber eine schwache TraO-Bande ist zu erkennen. Es kann sich um nicht-kovalent an die Matrix gebundenes TraO handeln. In der späteren Elution von Zytokinen ist diese Bande nicht mehr zu sehen. Die Bindekapazität der hergestellten TraO-Matrix wurde durch Messung der TraN-GFP-Fluoreszenz im Überstand ermit-

---

telt. Die Bindekapazität ist mit den Angaben kommerziell erhältlicher Affinitätsmatrices vergleichbar. Diese Angaben können Produktkatalogen unterschiedlicher Anbieter entnommen werden beispielsweise für Streptavidin-Sepharose (">300 nmol biotin/ml medium 6 mg biotinylated BSA/ml medium", GE-Healthcare), Glutathione Sepharose ("10 mg protein/ml", GE-Healthcare) oder Nickel-Sepharose ("40 mg protein/ml", GE-Healthcare). Die Wiederverwendbarkeit der Matrix wurde überprüft. Die Bindungskapazität nimmt mit wiederholter Verwendung leicht ab. Das kann an nicht-kovalent gebundenem TraO liegen, welches auch in der SDS-PAGE der TraO-Matrix teilweise erkennbar ist. Die bereits diskutierte automatisierte Herstellung einer homogenen TraO-Matrix oder eine weitere Optimierung von TraO können vorgenommen werden. Durch die N-terminale Fusion von TraN konnten drei rekombinante Zytokine hergestellt werden, deren wildtypische Genexpression mit dem pRSET-5b-Vektor in *E. coli* BL21(DE3) nicht möglich war. Da alle anderen Faktoren des Expressionssystems nicht verändert worden sind, ist der N-terminal fusionierte TraN-Abschnitt bzw. die zugrundeliegende Nukleotidsequenz für die erhebliche Steigerung der Expressionsausbeuten verantwortlich. Als Ursache hierfür kommt eine erhöhte Proteinstabilität durch den veränderten N-Terminus, vor allem aber die Auswirkung der dem TraN zugrundeliegenden Nukleotidsequenz in Betracht. Zur Kontrolle wurde ein weiteres Zytokin mit einem C-terminalen TraN kloniert und hergestellt. Bei dieser Anordnung war die Expressionsausbeute des Zytokins allerdings deutlich geringer im Vergleich zum wildtypischen Konstrukt. Der angefügte TraN-Abschnitt entstammt einem bakteriellen Konjugationssystem, welches auch in *E. coli* vorkommt. Damit verbunden ist der Codongebrauch (codon usage). Bestimmte Codons des universellen, degenerierten genetischen Codes werden von verschiedenen Spezies unterschiedlich häufig verwendet, was der tRNA-Konzentration innerhalb der Zelle entspricht [181]. Selten verwendete Codons können die Translation bremsen und häufig genutzte Codons beschleunigen die Translation [182]. Das Anfügen der TraN-Sequenz mit auf *E. coli* abgestimmter Codon-Verwendung könnte sich positiv auf die Expression des Gesamtproteins auswirken. Die Translation von Proteinen in *E. coli* ist stark von der dem Startcodon proximalen Nukleotidsequenz abhängig. So wird durch die sogenannte downstream box, ein dem Startcodon folgender, etwa 30 Nukleotide umspannender DNA-Abschnitt, eine verstärkte Ribosomenbindung und eine erhöhte Translationseffizienz beschrieben [183]. Die Kompatibilität dieses Abschnitts zum Anti-Codon-Loop des Ribosoms hat erhebliche Auswirkung auf das Expressionsergebnis, wie sich mehrfach auch in eigenen unveröffentlichten Arbeiten gezeigt hat. Zu vermuten ist, dass die Nukleotidsequenz des TraN eine bessere Anordnung gegenüber dem Anti-Codon herstellt als die entsprechenden Nukleotidsegmente der unveränderten Zytokine. Die Expression rekombinanter Gene in *E. coli* ist von einer Vielzahl von Faktoren abhängig [184] [185]. Medium, Plasmid, Bakterienstamm, Art der Kultur, pH-Wert und Temperatur sind nur einige Variablen, die die Proteinbiosynthese beeinflussen. Die Ergebnisse zur Steigerung der Zielproteinausbeute wurden bisher nur für das beschriebene Wirts-Vektorsystem unter den genannten Kulturbedingungen (Schüttelkultur bei 37 °C) bestätigt. Eine Übertragbarkeit auf andere *E. coli*-Expressionssysteme ist wahrscheinlich aber nicht sichergestellt. Auch kann vermutet werden, dass sich für viele weitere in diesem Expressionswirt schlecht exprimierbaren Proteine mit diesem Ansatz Steigerungen in der Zielproteinausbeute erzielen lassen.

Wie sich bereits in den Versuchen zur Wiederverwertbarkeit der TraO-Matrix zeigte, verbleibt ein Teil des gebundenen Fusionsproteins auf der Matrix. Bei TraN-fusionierten Zytokinen ist das ein erheblicher Anteil. Ein Grund kann die Löslichkeit des Analyten sein, die durch viele Faktoren wie dem pH-Wert

---

der Lösung, der Oberflächenhydrophobizität, der Verteilung der Oberflächenladung, der Größe, dem verwendeten Salz und dessen Konzentration beeinflusst wird [186]. Präzipitiertes Protein lässt sich mit dem gewählten Versuchsaufbau nicht von der Matrix separieren. Durch den Einsatz geeigneter Additive zur Verbesserung der Löslichkeit der Proteine oder durch Veränderungen im Inkubationsschema oder im Aufbau der Anreicherungsmethode (z.B. Säulenformat) könnten hinsichtlich dieser Problematik Verbesserungen erzielt werden. Im Vergleich zu den Anreicherungsversuchen mit den Zytokinen in Kap. 3.3.2 zeigte sich im Abschnitt 3.3.4 eine deutlich höhere Wiederfindung des TraNfull-GFP nach Elution. In Bezug auf die unterschiedlichen Elutionsabenteuere im Vergleich der beiden Versuchsaufbauten muss auch die bereits diskutierte Qualität und Homogenität der Matrix (siehe Kap. 4.1) in Betracht gezogen werden. Bisher liegen keine Daten dazu vor, welche Faktoren genau die Herstellung und Lagerung der TraO-Matrix beeinflussen und wie sich diese auf die Haltbarkeit der Matrix und die Bindungseffizienz und -spezifität auswirken. Auch können das zu reinigende Protein selbst und sein umgebendes Milieu (z. B. andere Proteine im Zelllysate) und dessen Wechselwirkungen einen Einfluss auf die Bindung von Ligand und Analyt haben. Wie so oft ist eine Maßstabsvergrößerung nicht einfach und bedarf weiterer umfassender Untersuchungen [187]. Der reproduzierbaren Herstellung der TraO-Matrix und ihrer geeigneten Lagerung sollte unter dem Gesichtspunkt einer wirtschaftlichen Aufreinigung von TraN-Fusionsproteinen Priorität eingeräumt werden.

Es konnte gezeigt werden, dass TraN-hM-CSF aus IB und Zelllysate biologische Aktivität besitzen. Der Aktivitätsassay wurde mehrfach durchgeführt um einen Effekt für TraN-hM-CSF nachweisen zu können, da die TraN-hM-CSF-Aktivität gegenüber der von reinem hM-CSF deutlich geringer ausfällt. Entweder liegt das TraN-hM-CSF größtenteils in einer falschen Faltung vor oder das TraN-Peptid stört auf Grund seiner räumlichen Nähe die Bindung an den Rezeptor. Bereits die erste Aminosäure im wildtypischen hM-CSF ist für eine Interaktion mit dem Rezeptor verantwortlich [188]. Um genauere Aussagen zur Ursache der verminderten Aktivität zu machen, kann das TraN-Peptid mit Faktor Xa abgespalten und erneut aufgereinigt oder eine alternative, nicht TraO-basierte Aufreinigung von TraN-hM-CSF durchgeführt werden. Außerdem müsste im Aktivitätstest eine Sättigung des Stimulationsfaktors erreicht werden.

Eine generelle Verwendbarkeit des TraN-Systems zur affinitätschromatographischen Reinigung von Proteinen, anhand rekombinanter Zytokine, konnte somit nachgewiesen werden. Die Zytokine konnten an einer Matrix spezifisch angereichert und anschließend eluiert werden, TraN konnte unter Verwendung einer Protease abgespalten werden und die biologische Aktivität eines auf diese Weise gereinigten Zytokins konnte exemplarisch für TraN-M-CSF nachgewiesen werden.

---

#### 4.5 Markierung löslicher Rezeptorketten

---

Markierte lösliche Zytokinrezeptorproteine stellen sehr wertvolle Werkzeuge für Rezeptor-Liganden-Interaktionsstudien dar. Derartige Rezeptorsonden könnten zur Identifizierung bzw. Charakterisierung von Zytokinmimetika oder anderen agonistisch oder antagonistisch wirksamen Substanzen verwendet werden. Das TraN/TraO-System stellt eine vielversprechende Option für die zielgerichtete Erzeugung von Proteinkonjugaten dar. Im Abschnitt 3.4.1 wurde untersucht, ob Fusionskonstrukte von TraO und Fluoreszenzproteinen für die Markierung von TraN-markierten Rezeptorproteinen verwendet werden können. Das TraN-Peptid, welches an die löslichen Rezeptoren fusioniert wurde, ist eine N- und C-terminal verkürzte Variante mit Aminosäureaustausch der vorhergesagten Glykosylierungsstelle (TraNshortNC-

---

T21A). Hierbei muss einschränkend erwähnt werden, dass in den Vorversuchen für diese Variante nur eine stark verminderte Affinität zu TraO festgestellt werden konnte. Trotzdem gelang eine Fluoreszenzmarkierung eines löslichen Rezeptors über die TraO/TraN-Interaktion und der Nachweis der Rezeptor-Ligandeninteraktion durch die angefügte Fluoreszenzaktivität. Erste Bindungsversuche wurden auf zwei verschiedene Arten, auf Ni-NTA-Matrix und Hitrap-Matrix durchgeführt. Innerhalb des pull-Down Experiments mit His/TraN-markiertem Rezeptorprotein an Ni-NTA-Agarose ist die TraO/TraN-Interaktion nur relativ schwach ausgeprägt, während die Bindung zwischen Ligand und Rezeptor deutlich besser, und schätzungsweise äquimolar, ist. Im Versuchsaufbau mit Matrix-gekoppelten Liganden kann eine solche Unterscheidung nicht gemacht werden. Für genauere Aussagen bezüglich der Gründe sollte der Versuch noch einmal mit dem TraN-Volllängen-Rezeptorkonstrukt wiederholt werden. Mit löslichen, über das TraO/TraN-System fluoreszenzmarkierten Rezeptorproteinen wurde der Nachweis von Rezeptor-Ligandeninteraktionen auf der Oberfläche von Zytokin-dekorierten Säugerzellen (HEK-293) versucht. Hierbei liegt eine gegenüber dem natürlichen Vorbild inverse Konstellation vor (membranständiger Ligand – löslicher Rezeptor), die für einige Screening- oder auch Selektionskonzepte neue methodische Möglichkeiten einräumen könnte. So können beispielsweise Mutantenbibliotheken auf der Oberfläche von Säugerzellen [189], Bakterien [190] oder Hefen [191] nach potentiellen Bindepartnern durchmustert werden.

HEK293T-Zellen konnten mit geeigneten Plasmiden zur Oberflächenpräsentation von membranständigen Zytokinen transfiziert werden. Der Nachweis der membranständigen Proteine über den zusätzlichen P5D4-Tag als Kontrolle war erfolgreich. Versucht man einen Nachweis des Zytokins auf der Zellmembran durch Rezeptor-TraN und TraO-Sonde, so sind die Ergebnisse nicht eindeutig. Der wahrscheinlichste Grund dafür ist die Verwendung des beidseitig verkürzten, modifizierten TraN an der Rezeptorkette. Ein weiterer Grund kann sein, dass das Zytokin zwar an der Oberfläche präsent ist, vom Rezeptor wegen sterischer Hinderungen aber nicht erkannt wird. Allerdings konnten am Institut für Biochemie II der FSU Jena die Präsentation der Zytokine auf der Oberfläche nachgewiesen werden. Deshalb sollte die rekombinante Herstellung der löslichen Rezeptorkette mit dem TraN-Volllängenkonstrukt ohne Glykosylierungsstelle vorangetrieben werden. Es ist damit zu rechnen, dass die erzielten Signale stärker sein werden und ggf. einen spezifischen Nachweis der Interaktion der Rezeptorsonden mit dem zellulär präsentierten Zytokin in Aussicht stellen. Die notwendigen Plasmide für verschiedene lösliche Rezeptorketten mit den unterschiedlichen TraN-Volllängenkonstrukten wurden bereits kloniert und mit Turbofect transient transfiziert. Bisher limitieren die Expressionsausbeuten der löslichen Rezeptordomänen den weiteren Fortschritt bei diesen Untersuchungen. Eine transientes Transfektionsverfahren Polyethylenimin (PEI) mit in Suspensionskultur wachsenden HEK293-EBNA1-Zellen bietet sich zur Verbesserung der Expressionsausbeuten an [192].

---

## 4.6 Markierung von TraN auf Zelloberflächen

---

Es wurde untersucht, ob das TraO/TraN-System geeignet ist, um eine Fluoreszenzfärbung von membranständigen Proteinen, die eine TraN-Markierung tragen, umzusetzen. Zu diesem Zweck wurde ein Plasmid, welches besonders erfolgreich ein Zytokin mit einem Tag auf der Oberfläche von HEK293T-Zellen generiert, mit einem zusätzlichen TraN-Tag versehen. Es ist klar erkennbar, dass die Zellen, die das TraN auf ihrer Oberfläche tragen, effektiv im FACS und in der Fluoreszenzmikroskopie durch eine in der Arbeit entwickelte TraO-Sonde markiert werden können. Damit konnte gezeigt werden, dass die Interaktion auf Zelloberflächen zu einem ausreichenden Signal führt, was die Grundlage für komplexere Markierungen von Zelloberflächenmolekülen bildet. Zusätzlich wurde der Nachweis der bifunktionalen Markierung erbracht. Durch das Einbringen von Cysteinen in TraO und TraN kann eine kovalente Bindung zwischen beiden Interaktionspartnern hergestellt werden, um Dissoziationen zu vermeiden und somit das Signal weiter zu verstärken [193].

---

## 4.7 Implementierung einer spezifischen Disulfidbrücken-Bildung innerhalb des TraO/TraN-Kopplungskonzeptes zur Herstellung kovalent verknüpfter Protein-Konjugate

---

Durch das Einbringen von Cysteinen in TraO und TraN stellt eine kovalente Bindung zwischen den Interaktionspartnern in Aussicht, was für verschiedene Anwendungen, wie eine irreversible Markierung oder Immobilisierung von Biomolekülen, von Nutzen sein kann. Dabei kann man sich zunutze machen, dass weder in TraO noch in TraN Cysteine vorhanden sind, wodurch falsche intramolekulare Cystein-Paarungen bei der Ausbildung der Disulfidbrücken während der Faltung der Proteine oder auch im späteren Einsatz ausgeschlossen sind. In der Arbeit ist der Nachweis Disulfid-verbrückter TraN und TraO-Derivate gelungen. Durch Zugabe einer bestimmten Menge eines reduzierenden Agens (DTT) konnte die Bildung kovalent verknüpfter Heterodimere aus TraO und TraN verstärkt werden. Dies eröffnet weitreichende Perspektiven für die Entwicklung weiterer Anwendungen. In der hochauflösenden Fluoreszenzmikroskopie können durch kovalente bioorthogonale Markierung über Protein-Tags in vivo biologischen Prozesse beobachtet werden. Ein solches Label sollte folgende Eigenschaften haben [194]: (1) die Möglichkeit der Markierung in einem Schritt; (2) schnelle, quantitative Markierung; (3) ausschließliche Markierung von Zielproteinen; (4) geringe Größe, um den Einfluss auf die Proteinfunktion zu minimieren; (5) Bildung einer stabilen, kovalenten Bindung zwischen Protein und Label; (6) keine Nebeneffekte der verwendeten Reagenzien; (7) es sollte in vitro und in vivo funktionieren. Keine existente Labelmethode erfüllt diese Anforderungen [194]. Neben der genetischen Fusion eines Fluoreszenzproteins mit dem Zielprotein stehen drei weitere Standardmethoden zur Verfügung, um ein Protein kovalent mit einer fluoreszierenden Sonde zu markieren [195]. Dabei handelt es sich um selbst-markierende Enzyme (SNAP-Tag [196], CLIP-Tag [197], Halo-Tag [198], TMP-Tag [199]), Tetracysteinmotive bindende Biarsen-Farbstoffe (FlAsH und ReAsH [200] [201]) und durch Enzyme katalysierte Markierung des Zielmoleküls mit der Sonde (Liponsäure-Ligase [202], Biotin-Ligase [203]). Die ersten beiden bedienen sich wie TraO/TraN dabei freier Thiolgruppen, die anfällig für oxidative Dimerisierung sind und in Form von Cystein in die Aminosäuresequenz eingebracht werden. Selbst-markierende Enzyme nutzen größere Tags und es kann zu sterischen Hinderungen kommen, welche den Metabolismus und die Funktion des Zielproteins beeinflussen [202] [193]. FlAsH und ReAsH sind Peptid-basierte posttranslationale Markierungsmethoden in



---

lebenden Zellen, allerdings wurden geringe Spezifität, Zelltoxizität, sowie Palmitoylierung und Oxidation des Zielproteins beschrieben [201] [204]. Nachteil der Ligasen ist, dass diese in der Zelle exprimiert werden müssen oder bei Markierung von Oberflächenproteinen zuzugeben sind. Das TraO/TraN-System kann für diese Applikationen eine Alternative bieten. Das cysteinhaltige TraN kann als Peptid gentechnisch an das Zielprotein fusioniert werden und mit dem cysteinhaltigen TraO markiert werden. Für solche und andere Nachweissysteme ist es außerdem nötig, die jeweiligen Sonden mit alternativen Fluorophoren auszustatten. Vorteile der genutzten Fusionsproteine mit photoaktivierbaren Fluorophoren der GFP-Familie ist ihre einfache Handhabbarkeit und hohe Spezifität [205] [193]. Dazu sind weitere Studien nötig. Es ist davon auszugehen, dass TraO und TraN nicht toxisch sind, da beide bereits problemlos in Eukaryonten exprimiert wurden.

---

#### 4.8 Nachweis der TraO/TraN-Interaktion im Western Blot und alternative Nachweismethoden

---

Im Western Blot konnten die beiden TraN-Volllängenkonstrukte, sowie das carboxyterminal verkürzte TraN nachgewiesen werden. Proteine werden durch die Zugabe von SDS und Wärme denaturiert [113], dabei bleibt die Bindeeigenschaft von TraN auf der Nitrocellulose-Membran erhalten. Die Kopplung von HRP an TraO erfolgte über primäre Amine. Auch in diesem Fall kann eine gerichtete Bindung zu höheren Ausbeuten führen. Trotz der Lagerung des TraO-HRP nach Herstellerangaben war das Konjugat nur über einen kurzen Zeitraum von etwa zwei Wochen biologisch aktiv. Weiterführende Untersuchungen konnten deshalb nicht gemacht werden. Neben der verwendeten Meerrettichperoxidase steht eine Fülle anderer Reporterenzyme zu Verfügung, die geläufigsten sind die Alkalische Phosphatase und die Glucose-Oxidase [206] [207] [208]. Wie bei der Nutzung von Fluorophoren bietet auch die enzymatische Markierung eine Vielzahl von Möglichkeiten, die nach Bedarf angepasst werden kann, aber nicht Gegenstand der Arbeit sind.

---

#### 4.9 Weitere Applikationen

---

Weitere Applikationen, für die TraO/TraN sehr interessant sein kann, ist die Tandem Affinity Purification [13] [14]. In diesem Zusammenhang wurde die Suche nach Bindungspartnern für  $\beta$ -Catenin ansatzweise verfolgt. Das amino- und carboxyterminal verkürzte TraN wurde bereits in ein entsprechendes pcDNA-Konstrukt kloniert, eine Transfektion in eukaryontischen Zellen durchgeführt und die Lysate analysiert. Auch in diesem Fall konnte keine TraO/TraN-Interaktion nachgewiesen werden, welche für weitergehende Studien, wie die Massenspektrometrie, stabil genug ist. Auch für diese Applikation ist die Verwendung des TraN-Volllängenkonstruktes zu empfehlen.

## Literatur

- [1] J. C. Venter, M. D. Adams, E. W. Myers, P. W. Li, R. J. Mural, G. G. Sutton, H. O. Smith, M. Yandell, C. A. Evans, R. A. Holt, J. D. Gocayne, P. Amanatides, R. M. Ballew, D. H. Huson, J. R. Wortman, Q. Zhang, C. D. Kodira, X. H. Zheng, L. Chen, M. Skupski, G. Subramanian, P. D. Thomas, J. Zhang, G. L. Gabor Miklos, C. Nelson, S. Broder, A. G. Clark, J. Nadeau, V. A. McKusick, N. Zinder, A. J. Levine, R. J. Roberts, M. Simon, C. Slayman, M. Hunkapiller, R. Bolanos, A. Delcher, I. Dew, D. Fasulo, M. Flanigan, L. Florea, A. Halpern, S. Hannenhalli, S. Kravitz, S. Levy, C. Mobarry, K. Reinert, K. Remington, J. Abu-Threideh, E. Beasley, K. Biddick, V. Bonazzi, R. Brandon, M. Cargill, I. Chandramouliswaran, R. Charlab, K. Chaturvedi, Z. Deng, V. Di Francesco, P. Dunn, K. Eilbeck, C. Evangelista, A. E. Gabrielian, W. Gan, W. Ge, F. Gong, Z. Gu, P. Guan, T. J. Heiman, M. E. Higgins, R. R. Ji, Z. Ke, K. A. Ketchum, Z. Lai, Y. Lei, Z. Li, J. Li, Y. Liang, X. Lin, F. Lu, G. V. Merkulov, N. Milshina, H. M. Moore, A. K. Naik, V. A. Narayan, B. Neelam, D. Nusskern, D. B. Rusch, S. Salzberg, W. Shao, B. Shue, J. Sun, Z. Wang, A. Wang, X. Wang, J. Wang, M. Wei, R. Wides, C. Xiao, C. Yan, A. Yao, J. Ye, M. Zhan, W. Zhang, H. Zhang, Q. Zhao, L. Zheng, F. Zhong, W. Zhong, S. Zhu, S. Zhao, D. Gilbert, S. Baumhueter, G. Spier, C. Carter, A. Cravchik, T. Woodage, F. Ali, H. An, A. Awe, D. Baldwin, H. Baden, M. Barnstead, I. Barrow, K. Beeson, D. Busam, A. Carver, A. Center, M. L. Cheng, L. Curry, S. Danaher, L. Davenport, R. Desilets, S. Dietz, K. Dodson, L. Doup, S. Ferriera, N. Garg, A. Gluecksmann, B. Hart, J. Haynes, C. Haynes, C. Heiner, S. Hladun, D. Hostin, J. Houck, T. Howland, C. Ibegwam, J. Johnson, F. Kalush, L. Kline, S. Koduru, A. Love, F. Mann, D. May, S. McCawley, T. McIntosh, I. McMullen, M. Moy, L. Moy, B. Murphy, K. Nelson, C. Pfannkoch, E. Pratts, V. Puri, H. Qureshi, M. Reardon, R. Rodriguez, Y. H. Rogers, D. Romblad, B. Ruhfel, R. Scott, C. Sitter, M. Smallwood, E. Stewart, R. Strong, E. Suh, R. Thomas, N. N. Tint, S. Tse, C. Vech, G. Wang, J. Wetter, S. Williams, M. Williams, S. Windsor, E. Winn-Deen, K. Wolfe, J. Zaveri, K. Zaveri, J. F. Abril, R. Guigó, M. J. Campbell, K. V. Sjolander, B. Karlak, A. Kejariwal, H. Mi, B. Lazareva, T. Hatton, A. Narechania, K. Diemer, A. Muruganujan, N. Guo, S. Sato, V. Bafna, S. Istrail, R. Lippert, R. Schwartz, B. Walenz, S. Yooseph, D. Allen, A. Basu, J. Baxendale, L. Blick, M. Caminha, J. Carnes-Stine, P. Caulk, Y. H. Chiang, M. Coyne, C. Dahlke, A. Mays, M. Dombroski, M. Donnelly, D. Ely, S. Esparham, C. Fosler, H. Gire, S. Glanowski, K. Glasser, A. Glodek, M. Gorokhov, K. Graham, B. Gropman, M. Harris, J. Heil, S. Henderson, J. Hoover, D. Jennings, C. Jordan, J. Jordan, J. Kasha, L. Kagan, C. Kraft, A. Levitsky, M. Lewis, X. Liu, J. Lopez, D. Ma, W. Majoros, J. McDaniel, S. Murphy, M. Newman, T. Nguyen, N. Nguyen, M. Nodell, S. Pan, J. Peck, M. Peterson, W. Rowe, R. Sanders, J. Scott, M. Simpson, T. Smith, A. Sprague, T. Stockwell, R. Turner, E. Venter, M. Wang, M. Wen, D. Wu, M. Wu, A. Xia, A. Zandieh, and X. Zhu. The sequence of the human genome. *Science*, 291(5507):1304–1351, Feb 2001.
- [2] Eric S Lander, Lauren M Linton, Bruce Birren, Chad Nusbaum, Michael C Zody, Jennifer Baldwin, Keri Devon, Ken Dewar, Michael Doyle, William FitzHugh, et al. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*, 409(6822):860–921, 2001.

- 
- [3] Sequencing Consortium et al. {Genome sequence of the nematode *C.elegans*: A platform for investigating biology}. Science, 282:2012–2018, 1998.
- [4] John K Colbourne, Michael E Pfrender, Donald Gilbert, W Kelley Thomas, Abraham Tucker, Todd H Oakley, Shinichi Tokishita, Andrea Aerts, Georg J Arnold, Malay Kumar Basu, et al. The ecoresponsive genome of daphnia pulex. Science, 331(6017):555–561, 2011.
- [5] Richard R Copley. The animal in the genome: comparative genomics and evolution. Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences, 363(1496):1453–1461, 2008.
- [6] Catherine Sanchez, Corinne Lachaize, Florence Janody, Bernard Bellon, Laurence Röder, Jérôme Euzenat, François Rechenmann, and Bernard Jacq. Grasping at molecular interactions and genetic networks in drosophila melanogaster using flynets, an internet database. Nucleic acids research, 27(1):89–94, 1999.
- [7] Ulrich Stelzl, Uwe Worm, Maciej Lalowski, Christian Haenig, Felix H Brembeck, Heike Goehler, Martin Stroedicke, Martina Zenkner, Anke Schoenherr, Susanne Koeppen, et al. A human protein-protein interaction network: a resource for annotating the proteome. Cell, 122(6):957–968, 2005.
- [8] E. Golemis and P.D. Adams. Protein-protein Interactions: A Molecular Cloning Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2005.
- [9] Michael PH Stumpf, Thomas Thorne, Eric de Silva, Ronald Stewart, Hyeong Jun An, Michael Lappe, and Carsten Wiuf. Estimating the size of the human interactome. Proceedings of the National Academy of Sciences, 105(19):6959–6964, 2008.
- [10] Luis A Nunes Amaral. A truer measure of our ignorance. Proceedings of the National Academy of Sciences, 105(19):6795–6796, 2008.
- [11] Trey Ideker and Roded Sharan. Protein networks in disease. Genome research, 18(4):644–652, 2008.
- [12] Stanley Fields and Ok-kyu Song. A novel genetic system to detect protein protein interactions. 1989.
- [13] James T Kadonaga and Robert Tjian. Affinity purification of sequence-specific dna binding proteins. Proceedings of the National Academy of Sciences, 83(16):5889–5893, 1986.
- [14] Oscar Puig, Friederike Caspary, Guillaume Rigaut, Berthold Rutz, Emmanuelle Bouveret, Elisabeth Bragado-Nilsson, Matthias Wilm, and Bertrand Séraphin. The tandem affinity purification (tap) method: a general procedure of protein complex purification. Methods, 24(3):218–229, 2001.
- [15] P. McLaughlin, A. J. Grillo-López, B. K. Link, R. Levy, M. S. Czuczman, M. E. Williams, M. R. Heyman, I. Bence-Bruckler, C. A. White, F. Cabanillas, V. Jain, A. D. Ho, J. Lister, K. Wey, D. Shen, and B. K. Dallaire. Rituximab chimeric anti-cd20 monoclonal antibody therapy for relapsed indolent lymphoma: half of patients respond to a four-dose treatment program. J Clin Oncol, 16(8):2825–2833, Aug 1998.

- 
- [16] E. Aboud-Pirak, E. Hurwitz, M. E. Pirak, F. Bellot, J. Schlessinger, and M. Sela. Efficacy of antibodies to epidermal growth factor receptor against kb carcinoma in vitro and in nude mice. *J Natl Cancer Inst*, 80(20):1605–1611, Dec 1988.
- [17] Ismet Sarikaya, Ali Sarikaya, and Richard C. Reba. Gamma probes and their use in tumor detection in colorectal cancer. *Int Semin Surg Oncol*, 5:25, 2008.
- [18] A Matthew. Current biosensor technologies in drug discovery. *Drug Discovery*, page 69, 2006.
- [19] K. Wüthrich. The way to nmr structures of proteins. *Nat Struct Biol*, 8(11):923–925, Nov 2001.
- [20] J. C. KENDREW, G. BODO, H. M. DINTZIS, R. G. PARRISH, H. WYCKOFF, and D. C. PHILLIPS. A three-dimensional model of the myoglobin molecule obtained by x-ray analysis. *Nature*, 181(4610):662–666, Mar 1958.
- [21] Ewen Callaway. The revolution will not be crystallized: a new method sweeps through structural biology. *Nature*, 525(7568):172–174, Sep 2015.
- [22] E. M. Phizicky and S. Fields. Protein-protein interactions: methods for detection and analysis. *Microbiol Rev*, 59(1):94–123, Mar 1995.
- [23] Erich Heftmann. *Chromatography: Fundamentals and Applications of Chromatography and Related Differential Migration Methods-Part B: Applications*. Journal of Chromatography Library, Volume 69B. Elsevier Science & Technology, 2004.
- [24] K. Terpe. Overview of tag protein fusions: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Appl Microbiol Biotechnol*, 60(5):523–533, Jan 2003.
- [25] J. Nilsson, S. Ståhl, J. Lundeberg, M. Uhlén, and P. A. Nygren. Affinity fusion strategies for detection, purification, and immobilization of recombinant proteins. *Protein Expr Purif*, 11(1):1–16, Oct 1997.
- [26] J. PORATH and P. FLODIN. Gel filtration: a method for desalting and group separation. *Nature*, 183(4676):1657–1659, Jun 1959.
- [27] S. HJERTEN and R. MOSBACH. mmolecular-sievechromatography of proteins on columns of cross-linked polyacrylamide. *Anal Biochem*, 3:109–118, Feb 1962.
- [28] T. G. Schmidt and A. Skerra. The random peptide library-assisted engineering of a c-terminal affinity peptide, useful for the detection and purification of a functional ig fv fragment. *Protein Eng*, 6(1):109–122, Jan 1993.
- [29] T. G. Schmidt, J. Koepke, R. Frank, and A. Skerra. Molecular interaction between the strep-tag affinity peptide and its cognate target, streptavidin. *J Mol Biol*, 255(5):753–766, Feb 1996.
- [30] S. Voss and A. Skerra. Mutagenesis of a flexible loop in streptavidin leads to higher affinity for the strep-tag ii peptide and improved performance in recombinant protein purification. *Protein Eng*, 10(8):975–982, Aug 1997.

- 
- [31] Ingo P. Korndörfer and Arne Skerra. Improved affinity of engineered streptavidin for the strep-tag ii peptide is due to a fixed open conformation of the lid-like loop at the binding site. *Protein Sci*, 11(4):883–893, Apr 2002.
- [32] N. Smyth, U. Odenthal, B. Merkl, and M. Paulsson. Eukaryotic expression and purification of recombinant extracellular matrix proteins carrying the strep ii tag. *Methods Mol Biol*, 139:49–57, 2000.
- [33] J. T. Murphy and J. C. Lagarias. Purification and characterization of recombinant affinity peptide-tagged oat phytochrome a. *Photochem Photobiol*, 65(4):750–758, Apr 1997.
- [34] Martin Drucker, Remy Froissart, Eugénie Hébrard, Marilyne Uzest, Marc Ravallec, Pascal Espérandieu, Jean-Claude Mani, Martine Pugnière, Françoise Roquet, Alberto Fereres, and Stéphane Blanc. Intracellular distribution of viral gene products regulates a complex mechanism of cauliflower mosaic virus acquisition by its aphid vector. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(4):2422–2427, Feb 2002.
- [35] Barbara Maertens, Anne Spriestersbach, Jan Kubicek, and Frank Schäfer. Strep-tagged protein purification. *Methods Enzymol*, 559:53–69, 2015.
- [36] J. Porath, J. Carlsson, I. Olsson, and G. Belfrage. Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation. *Nature*, 258(5536):598–599, Dec 1975.
- [37] E. Hochuli. Large-scale chromatography of recombinant proteins. *J Chromatogr*, 444:293–302, Jul 1988.
- [38] S. F. Le Grice and F. Grüninger-Leitch. Rapid purification of homodimer and heterodimer hiv-1 reverse transcriptase by metal chelate affinity chromatography. *Eur J Biochem*, 187(2):307–314, Jan 1990.
- [39] D. C. Kaslow and J. Shiloach. Production, purification and immunogenicity of a malaria transmission-blocking vaccine candidate: Tbv25h expressed in yeast and purified using nickel-nta agarose. *Biotechnology (N Y)*, 12(5):494–499, May 1994.
- [40] E. S. Kotova, I. V. Sorokina, S. B. Akopov, L. G. Nikolaev, and E. D. Sverdlov. Expression of chicken ctfc gene in cos-1 cells and partial purification of ctfc protein. *Biochemistry (Mosc)*, 78(8):879–883, Aug 2013.
- [41] A. Kuusinen, M. Arvola, C. Oker-Blom, and K. Keinänen. Purification of recombinant glur-d glutamate receptor produced in sf21 insect cells. *Eur J Biochem*, 233(3):720–726, Nov 1995.
- [42] J. Wu and M. Filutowicz. Hexahistidine (his6)-tag dependent protein dimerization: a cautionary tale. *Acta Biochim Pol*, 46(3):591–599, 1999.
- [43] Thomas P. Hopp, Kathryn S. Prickett, Virginia L. Price, Randell T. Libby, Carl J. March, Douglas Pat Cerretti, David L. Urdal, and Paul J. Conlon. A short polypeptide marker sequence useful for recombinant protein identification and purification. *Nat Biotech*, 6(10):1204–1210, 1988. 10.1038/nbt1088-1204.

- 
- [44] A. Knappik and A. Plückthun. An improved affinity tag based on the flag peptide for the detection and purification of recombinant antibody fragments. *Biotechniques*, 17(4):754–761, Oct 1994.
- [45] M. J. Guimarães, D. Peterson, A. Vicari, B. G. Cocks, N. G. Copeland, D. J. Gilbert, N. A. Jenkins, D. A. Ferrick, R. A. Kastelein, J. F. Bazan, and A. Zlotnik. Identification of a novel seld homolog from eukaryotes, bacteria, and archaea: is there an autoregulatory mechanism in selenocysteine metabolism? *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93(26):15086–15091, Dec 1996.
- [46] M. Mazumdar, A. Mikami, M. A. Gee, and R. B. Vallee. In vitro motility from recombinant dynein heavy chain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93(13):6552–6556, Jun 1996.
- [47] A. S. Robeva, R. Woodard, D. R. Luthin, H. E. Taylor, and J. Linden. Double tagging recombinant a1- and a2a-adenosine receptors with hexahistidine and the flag epitope. development of an efficient generic protein purification procedure. *Biochem Pharmacol*, 51(4):545–555, Feb 1996.
- [48] K. Wilson, D. J. Mole, M. Binnie, N Z M. Homer, X. Zheng, B. A. Yard, J. P. Iredale, M. Auer, and S. P. Webster. Bacterial expression of human kynurenine 3-monooxygenase: solubility, activity, purification. *Protein Expr Purif*, 95:96–103, Mar 2014.
- [49] Ryan W. Huyck, Andrew Keightley, and John H. Laity. Expression and purification of full length mouse metal response element binding transcription factor-1 using pichia pastoris. *Protein Expr Purif*, 85(1):86–93, Sep 2012.
- [50] Yongliang Lu, Lihong Shen, Hongli Li, Daixi Hu, Xifeng Zhang, Bin Hu, Tao Feng, and Jiayi Huang. [establishment of hepatic stem cell line stably expressing hbx protein and the effect of hbx on cell proliferation]. *Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi*, 29(3):256–260, Mar 2013.
- [51] Adam Skarka, Lucie Škarydová, Hana Štambergová, and Vladimír Wsól. Purification and reconstitution of human membrane-bound dhps7 (sdr34c1) from sf9 cells. *Protein Expr Purif*, 95:44–49, Mar 2014.
- [52] A. Einhauer and A. Jungbauer. The flag peptide, a versatile fusion tag for the purification of recombinant proteins. *J Biochem Biophys Methods*, 49(1-3):455–465, Oct 2001.
- [53] Kenneth P LeClair, Michael A Blonar, and Phillip A Sharp. The p50 subunit of nf-kappa b associates with the nf-il6 transcription factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 89(17):8145–8149, 1992.
- [54] Cheng-Ming Chiang and Robert G Roeder. Expression and purification of general transcription factors by flag epitope-tagging and peptide elution. *Peptide research*, 6(2):62–64, 1992.
- [55] T. E. Kreis. Microinjected antibodies against the cytoplasmic domain of vesicular stomatitis virus glycoprotein block its transport to the cell surface. *EMBO J*, 5(5):931–941, May 1986.
- [56] D. B. Smith and K. S. Johnson. Single-step purification of polypeptides expressed in escherichia coli as fusions with glutathione s-transferase. *Gene*, 67(1):31–40, Jul 1988.

- 
- [57] Sandra Harper and David W. Speicher. Purification of proteins fused to glutathione s-transferase. *Methods Mol Biol*, 681:259–280, 2011.
- [58] H. Bedouelle and P. Duplay. Production in *escherichia coli* and one-step purification of bifunctional hybrid proteins which bind maltose. export of the klenow polymerase into the periplasmic space. *Eur J Biochem*, 171(3):541–549, Feb 1988.
- [59] D. Sachdev and J. M. Chirgwin. Properties of soluble fusions between mammalian aspartic proteinases and bacterial maltose-binding protein. *J Protein Chem*, 18(1):127–136, Jan 1999.
- [60] A. Forsgren and J. Sjöquist. pprotein affrom *s. aureus*. i. pseudo-immune reaction with human gamma-globulin. *J Immunol*, 97(6):822–827, Dec 1966.
- [61] Amreeta Dhanoa, Vivek Ajit Singh, Azura Mansor, Mohd Yasim Yusof, King-Ting Lim, and Kwai-Lin Thong. Acute haematogenous community-acquired methicillin-resistant *staphylococcus aureus* osteomyelitis in an adult: case report and review of literature. *BMC Infect Dis*, 12:270, 2012.
- [62] L. Björck and G. Kronvall. Purification and some properties of streptococcal protein g, a novel igg-binding reagent. *J Immunol*, 133(2):969–974, Aug 1984.
- [63] Gary Walsh. Biopharmaceutical benchmarks 2010. *Nat Biotechnol*, 28(9):917–924, Sep 2010.
- [64] Gary Walsh. Biopharmaceutical benchmarks 2014. *Nat Biotechnol*, 32(10):992–1000, Oct 2014.
- [65] J. C. Smith, R. B. Derbyshire, E. Cook, L. Dunthorne, J. Viney, S. J. Brewer, H. M. Sassenfeld, and L. D. Bell. Chemical synthesis and cloning of a poly(arginine)-coding gene fragment designed to aid polypeptide purification. *Gene*, 32(3):321–327, Dec 1984.
- [66] Helmut M. Sassenfeld and Stephen J. Brewer. A polypeptide fusion designed for the purification of recombinant proteins. *Nat Biotech*, 2(1):76–81, 1984. 10.1038/nbt0184-76.
- [67] K. Nagai and H. C. Thøgersen. Synthesis and sequence-specific proteolysis of hybrid proteins produced in *escherichia coli*. *Methods Enzymol*, 153:461–481, 1987.
- [68] S. Nock, J. A. Spudich, and P. Wagner. Reversible, site-specific immobilization of polyarginine-tagged fusion proteins on mica surfaces. *FEBS Lett*, 414(2):233–238, Sep 1997.
- [69] Gabriel Waksman. Bacterial secretion comes of age. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 367(1592):1014–1015, Apr 2012.
- [70] T. D. Lawley, W. A. Klimke, M. J. Gubbins, and L. S. Frost. F factor conjugation is a true type iv secretion system. *FEMS Microbiol Lett*, 224(1):1–15, Jul 2003.
- [71] Elisabeth Grohmann, Günther Muth, and Manuel Espinosa. Conjugative plasmid transfer in gram-positive bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev*, 67(2):277–301, table of contents, Jun 2003.
- [72] Eric Cascales and Peter J. Christie. The versatile bacterial type iv secretion systems. *Nat Rev Microbiol*, 1(2):137–149, Nov 2003.
-

- 
- [73] D. Hofreuter, S. Odenbreit, and R. Haas. Natural transformation competence in *helicobacter pylori* is mediated by the basic components of a type iv secretion system. *Mol Microbiol*, 41(2):379–391, Jul 2001.
- [74] Peter J. Christie. Type iv secretion: the *agrobacterium virb/d4* and related conjugation systems. *Biochim Biophys Acta*, 1694(1-3):219–234, Nov 2004.
- [75] Gabriel Waksman and Rémi Fronzes. Molecular architecture of bacterial type iv secretion systems. *Trends Biochem Sci*, 35(12):691–698, Dec 2010.
- [76] B. Dreiseikelmann. Translocation of dna across bacterial membranes. *Microbiol Rev*, 58(3):293–316, Sep 1994.
- [77] Karin Wallden, Angel Rivera-Calzada, and Gabriel Waksman. Type iv secretion systems: versatility and diversity in function. *Cell Microbiol*, 12(9):1203–1212, Sep 2010.
- [78] Cristina E. Alvarez-Martinez and Peter J. Christie. Biological diversity of prokaryotic type iv secretion systems. *Microbiol Mol Biol Rev*, 73(4):775–808, Dec 2009.
- [79] G. A. Kuldau, G. De Vos, J. Owen, G. McCaffrey, and P. Zambryski. The *virb* operon of *agrobacterium tumefaciens* *ptic58* encodes 11 open reading frames. *Mol Gen Genet*, 221(2):256–266, Apr 1990.
- [80] A. Beijersbergen, A. D. Dulk-Ras, R. A. Schilperoort, and P. J. Hooykaas. Conjugative transfer by the virulence system of *agrobacterium tumefaciens*. *Science*, 256(5061):1324–1327, May 1992.
- [81] P. J. Christie. *Agrobacterium tumefaciens* t-complex transport apparatus: a paradigm for a new family of multifunctional transporters in eubacteria. *J Bacteriol*, 179(10):3085–3094, May 1997.
- [82] E. M. Lai, O. Chesnokova, L. M. Banta, and C. I. Kado. Genetic and environmental factors affecting t-pilin export and t-pilus biogenesis in relation to flagellation of *agrobacterium tumefaciens*. *J Bacteriol*, 182(13):3705–3716, Jul 2000.
- [83] W. Pansegrau and E. Lanka. Enzymology of dna transfer by conjugative mechanisms. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*, 54:197–251, 1996.
- [84] F. X. Gomis-Rüth, G. Moncalián, R. Pérez-Luque, A. González, E. Cabezón, F. de la Cruz, and M. Coll. The bacterial conjugation protein *trwB* resembles ring helicases and *f1*-atpase. *Nature*, 409(6820):637–641, Feb 2001.
- [85] Savvas N. Savvides, Hye-Jeong Yeo, Moriah R. Beck, Franca Blaesing, Rudi Lurz, Erich Lanka, Renate Buhrdorf, Wolfgang Fischer, Rainer Haas, and Gabriel Waksman. *Virb11* atpases are dynamic hexameric assemblies: new insights into bacterial type iv secretion. *EMBO J*, 22(9):1969–1980, May 2003.
- [86] Karin Walldén, Robert Williams, Jun Yan, Pei W. Lian, Luchun Wang, Konstantinos Thalassinou, Elena V. Orlova, and Gabriel Waksman. Structure of the *virb4* atpase, alone and bound to the core complex of a type iv secretion system. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109(28):11348–11353, Jul 2012.



- 
- [87] Angel Rivera-Calzada, Rémi Fronzes, Christos G. Savva, Vidya Chandran, Pei W. Lian, Toon Laeremans, Els Pardon, Jan Steyaert, Han Remaut, Gabriel Waksman, and Elena V. Orlova. Structure of a bacterial type iv secretion core complex at subnanometre resolution. *EMBO J*, 32(8):1195–1204, Apr 2013.
- [88] Krishnamohan Atmakuri, Eric Cascales, and Peter J. Christie. Energetic components vird4, virb11 and virb4 mediate early dna transfer reactions required for bacterial type iv secretion. *Mol Microbiol*, 54(5):1199–1211, Dec 2004.
- [89] Peter J. Christie, Krishnamohan Atmakuri, Vidhya Krishnamoorthy, Simon Jakubowski, and Eric Cascales. Biogenesis, architecture, and function of bacterial type iv secretion systems. *Annu Rev Microbiol*, 59:451–485, 2005.
- [90] Simon J. Jakubowski, Jennifer E. Kerr, Isaac Garza, Vidhya Krishnamoorthy, Richard Bayliss, Gabriel Waksman, and Peter J. Christie. Agrobacterium virb10 domain requirements for type iv secretion and t pilus biogenesis. *Mol Microbiol*, 71(3):779–794, Feb 2009.
- [91] L. B. Anderson, A. V. Hertz, and A. Das. Agrobacterium tumefaciens virb7 and virb9 form a disulfide-linked protein complex. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93(17):8889–8894, Aug 1996.
- [92] C. Baron, Y. R. Thorstenson, and P. C. Zambryski. The lipoprotein virb7 interacts with virb9 in the membranes of agrobacterium tumefaciens. *J Bacteriol*, 179(4):1211–1218, Feb 1997.
- [93] A. Das, L. B. Anderson, and Y. H. Xie. Delineation of the interaction domains of agrobacterium tumefaciens virb7 and virb9 by use of the yeast two-hybrid assay. *J Bacteriol*, 179(11):3404–3409, Jun 1997.
- [94] M. Lessl and E. Lanka. Common mechanisms in bacterial conjugation and ti-mediated t-dna transfer to plant cells. *Cell*, 77(3):321–324, May 1994.
- [95] J.M. Berg, J.L. Tymoczko, L. Stryer, B. Häcker, A. Held, C. Lange, K. Mahlke, G. Maxam, L. Seidler, and N. Zellerhoff. *Stryer Biochemie*. Spektrum Akademischer Verlag, 2009.
- [96] K. E. Mortelmans and B. A. Stocker. Ultraviolet light protection, enhancement of ultraviolet light mutagenesis, and mutator effect of plasmid r46 in salmonella typhimurium. *J Bacteriol*, 128(1):271–282, Oct 1976.
- [97] K. E. Mortelmans and B. A. Stocker. Segregation of the mutator property of plasmid r46 from its ultraviolet-protecting property. *Mol Gen Genet*, 167(3):317–327, Jan 1979.
- [98] R. M. Hall. pkm101 is an is46-promoted deletion of r46. *Nucleic Acids Res*, 15(13):5479, Jul 1987.
- [99] P. J. Langer, W. G. Shanabruch, and G. C. Walker. Functional organization of plasmid pkm101. *J Bacteriol*, 145(3):1310–1316, Mar 1981.
- [100] P. J. Christie and J. P. Vogel. Bacterial type iv secretion: conjugation systems adapted to deliver effector molecules to host cells. *Trends Microbiol*, 8(8):354–360, Aug 2000.
-

- 
- [101] T. B. Cao and MH Saier, Jr. Conjugal type iv macromolecular transfer systems of gram-negative bacteria: organismal distribution, structural constraints and evolutionary conclusions. *Microbiology*, 147(Pt 12):3201–3214, Dec 2001.
- [102] Rémi Fronzes, Eva Schäfer, Luchun Wang, Helen R. Saibil, Elena V. Orlova, and Gabriel Waksman. Structure of a type iv secretion system core complex. *Science*, 323(5911):266–268, Jan 2009.
- [103] Vidya Chandran, Rémi Fronzes, Stéphane Duquerroy, Nora Cronin, Jorge Navaza, and Gabriel Waksman. Structure of the outer membrane complex of a type iv secretion system. *Nature*, 462(7276):1011–1015, Dec 2009.
- [104] Richard Bayliss, Richard Harris, Loic Coutte, Amy Monier, Remi Fronzes, Peter J. Christie, Paul C. Driscoll, and Gabriel Waksman. Nmr structure of a complex between the virb9/virb7 interaction domains of the pkm101 type iv secretion system. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104(5):1673–1678, Jan 2007.
- [105] D. Hanahan. Studies on transformation of escherichia coli with plasmids. *J Mol Biol*, 166(4):557–580, Jun 1983.
- [106] Anton P J. Middelberg. Preparative protein refolding. *Trends Biotechnol*, 20(10):437–443, Oct 2002.
- [107] E. D. Clark. Protein refolding for industrial processes. *Curr Opin Biotechnol*, 12(2):202–207, Apr 2001.
- [108] H.C. Bimboim and J. Doly. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid dna. *Nucleic Acids Research*, 7(6):1513–1523, 1979.
- [109] K. Mullis, F. Faloona, S. Scharf, R. Saiki, G. Horn, and H. Erlich. Specific enzymatic amplification of dna in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 51 Pt 1:263–73, 1986. Mullis, K Faloona, F Scharf, S Saiki, R Horn, G Erlich, H eng 1986/01/01 Cold Spring Harb Symp Quant Biol. 1986;51 Pt 1:263-73.
- [110] R. K. Saiki, D. H. Gelfand, S. Stoffel, S. J. Scharf, R. Higuchi, G. T. Horn, K. B. Mullis, and H. A. Erlich. Primer-directed enzymatic amplification of dna with a thermostable dna polymerase. *Science*, 239(4839):487–91, 1988. Saiki, R K Gelfand, D H Stoffel, S Scharf, S J Higuchi, R Horn, G T Mullis, K B Erlich, H A eng New York, N.Y. 1988/01/29 Science. 1988 Jan 29;239(4839):487-91.
- [111] Andreas Wohlmann. Signaltransduktion, spezifische Hemmung und biotechnologische Anwendung des humanen TSLP-Rezeptors. PhD thesis, 2014. Darmstadt, Techn. Univ., Diss., 2014.
- [112] K. V. Wood, J. R. de Wet, N. Dewji, and M. DeLuca. Synthesis of active firefly luciferase by in vitro translation of rna obtained from adult lanterns. *Biochem Biophys Res Commun*, 124(2):592–596, Oct 1984.
- [113] Arnold L Shapiro, Eladio Viñuela, and Jacob V Maizel. Molecular weight estimation of polypeptide chains by electrophoresis in sds-polyacrylamide gels. *Biochemical and biophysical research communications*, 28(5):815–820, 1967.

- 
- [114] U. K. LAEMMLI. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage t4. *Nature*, 227(5259):680–685, August 1970.
- [115] T.S. Meyer and B.L. Lamberts. Use of coomassie brilliant blue {R250} for the electrophoresis of microgram quantities of parotid saliva proteins on acrylamide-gel strips. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 107(1):144 – 145, 1965.
- [116] H. Towbin, T. Staehelin, and J. Gordon. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 76(9):4350–4, 1979. Towbin, H Staehelin, T Gordon, J eng 1979/09/01 *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1979 Sep;76(9):4350-4.
- [117] MG Pluskal, MB Przekop, MR Kavonian, C Vecoli, and DA Hicks. Immobilon pvdF transfer membrane-a new membrane substrate for western blotting of proteins. *BioTechniques*, 4(3):272–283, 1986.
- [118] G. H. LATHE and C. R. RUTHVEN. The separation of substances on the basis of their molecular weights, using columns of starch and water. *Biochem J*, 60(4):xxxiv, Aug 1955.
- [119] G. H. LATHE and C. R. RUTHVEN. The separation of substances and estimation of their relative molecular sizes by the use of columns of starch in water. *Biochem J*, 62(4):665–674, Apr 1956.
- [120] Chi-San Wu. *Handbook Of Size Exclusion Chromatography And Related Techniques: Revised And Expanded*, volume 91. CRC Press, 2003.
- [121] Richard N Day, Cynthia F Booker, and Ammasi Periasamy. Characterization of an improved donor fluorescent protein for förster resonance energy transfer microscopy. *Journal of biomedical optics*, 13(3):031203–031203, 2008.
- [122] R. L. Idzerda, C. J. March, B. Mosley, S. D. Lyman, T. Vanden Bos, S. D. Gimpel, W. S. Din, K. H. Grabstein, M. B. Widmer, and L. S. Park. Human interleukin 4 receptor confers biological responsiveness and defines a novel receptor superfamily. *J Exp Med*, 171(3):861–873, Mar 1990.
- [123] Abhinav A Shukla and Uwe Gottschalk. Single-use disposable technologies for biopharmaceutical manufacturing. *Trends in biotechnology*, 31(3):147–154, 2013.
- [124] Adriana G Lopes. Single-use in the biopharmaceutical industry: A review of current technology impact, challenges and limitations. *Food and Bioproducts Processing*, 93:98–114, 2015.
- [125] Ewa Laskowska, Dorota Kuczyńska-Wiśnik, Joanna Skórko-Glonek, and Alina Taylor. Degradation by proteases lon, clp and htra, of escherichia coli proteins aggregated in vivo by heat shock; htra protease action in vivo and in vitro. *Molecular microbiology*, 22(3):555–571, 1996.
- [126] O Van Wuytswinkel, G Savino, and JF Briat. Purification and characterization of recombinant pea-seed ferritins expressed in escherichia coli: influence of n-terminus deletions on protein solubility and core formation in vitro. *Biochemical journal*, 305(1):253–261, 1995.
-

- 
- [127] Mark P Miller and Sudhir Kumar. Understanding human disease mutations through the use of interspecific genetic variation. *Human Molecular Genetics*, 10(21):2319–2328, 2001.
- [128] Leonid A Mirny and Eugene I Shakhnovich. Universally conserved positions in protein folds: reading evolutionary signals about stability, folding kinetics and function. *Journal of molecular biology*, 291(1):177–196, 1999.
- [129] Pauline C Ng and Steven Henikoff. Predicting the effects of amino acid substitutions on protein function. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.*, 7:61–80, 2006.
- [130] Andre Collioud, Jean Francois Clemence, Michael Saenger, and Hans Sigrist. Oriented and covalent immobilization of target molecules to solid supports: Synthesis and application of a light-activatable and thiol-reactive cross-linking reagent. *Bioconjugate chemistry*, 4(6):528–536, 1993.
- [131] Greg T Hermanson. *Bioconjugation techniques*. Academic Press, 10:0123705010, 2008.
- [132] Federica Rusmini, Zhiyuan Zhong, and Jan Feijen. Protein immobilization strategies for protein biochips. *Biomacromolecules*, 8(6):1775–1789, 2007.
- [133] Jaroslava Turkova. Oriented immobilization of biologically active proteins as a tool for revealing protein interactions and function. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 722(1):11–31, 1999.
- [134] Bin Lu, Malcolm R Smyth, and Richard O’Kennedy. Tutorial review. oriented immobilization of antibodies and its applications in immunoassays and immunosensors. *Analyst*, 121(3):29R–32R, 1996.
- [135] AS Cohen and BL Karger. High-performance sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel capillary electrophoresis of peptides and proteins. *Journal of Chromatography A*, 397:409–417, 1987.
- [136] Paul D Grossman and Joel C Colburn. *Capillary electrophoresis: Theory and practice*. Academic Press, 2012.
- [137] James S Nowick. Exploring  $\beta$ -sheet structure and interactions with chemical model systems. *Accounts of chemical research*, 41(10):1319–1330, 2008.
- [138] M. P. Williamson. The structure and function of proline-rich regions in proteins. *Biochem J*, 297 ( Pt 2):249–260, Jan 1994.
- [139] J. H. Hurley, D. A. Mason, and B. W. Matthews. Flexible-geometry conformational energy maps for the amino acid residue preceding a proline. *Biopolymers*, 32(11):1443–1446, Nov 1992.
- [140] M. W. MacArthur and J. M. Thornton. Influence of proline residues on protein conformation. *J Mol Biol*, 218(2):397–412, Mar 1991.
- [141] J. F. Brandts, H. R. Halvorson, and M. Brennan. Consideration of the possibility that the slow step in protein denaturation reactions is due to cis-trans isomerism of proline residues. *Biochemistry*, 14(22):4953–4963, Nov 1975.

- 
- [142] Michael R Barnes and Ian C Gray. Introduction: The role of genetic bioinformatics. *Bioinformatics for Geneticists*, pages 1–19, 2003.
- [143] Ruibao Ren, Bruce J Mayer, Piera Cicchetti, and David Baltimore. Identification of a ten-amino acid proline-rich sh3 binding site. *Science*, 259(5098):1157–1161, 1993.
- [144] Olivier Staub, Sascha Dho, P Henry, Judy Correa, Toru Ishikawa, Jane McGlade, and D Rotin. Ww domains of nedd4 bind to the proline-rich py motifs in the epithelial na<sup>+</sup> channel deleted in liddle’s syndrome. *The EMBO journal*, 15(10):2371, 1996.
- [145] Staffan Magnusson, Torben E Petersen, Lars Sottrup-Jensen, and Hendrik Claeys. Complete primary structure of prothrombin: Isolation, structure and reactivity of ten carboxylated glutamic acid residues and regulation of prothrombin activation by thrombin. *Proteases and biological control*, 2:123–149, 1975.
- [146] Kiyoshi Nagai and Hans Christian Thøgersen. Generation of  $\beta$ -globin by sequence-specific proteolysis of a hybrid protein produced in escherichia coli. 1984.
- [147] Richard J Jenny, Kenneth G Mann, and Roger L Lundblad. A critical review of the methods for cleavage of fusion proteins with thrombin and factor xa. *Protein expression and purification*, 31(1):1–11, 2003.
- [148] F Al-Obeidi and JA Ostrem. Factor xa inhibitors. *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, 9(7):931–953, 1999.
- [149] Elisabeth Gasteiger, Christine Hoogland, Alexandre Gattiker, S’everine Duvaud, Marc R Wilkins, Ron D Appel, and Amos Bairoch. Protein identification and analysis tools on the ExPASy server. Springer, 2005.
- [150] Germán L Rosano and Eduardo A Ceccarelli. Recombinant protein expression in escherichia coli: advances and challenges. *Recombinant protein expression in microbial systems*, page 7, 2014.
- [151] Joseph E Tropea, Scott Cherry, and David S Waugh. Expression and purification of soluble his 6-tagged tev protease. *High Throughput Protein Expression and Purification: Methods and Protocols*, pages 297–307, 2009.
- [152] TD Parks, KK Leuther, ED Howard, SA Johnston, and WG Dougherty. Release of proteins and peptides from fusion proteins using a recombinant plant virus proteinase. *Analytical biochemistry*, 216(2):413–417, 1994.
- [153] James C Carrington and William G Dougherty. A viral cleavage site cassette: identification of amino acid sequences required for tobacco etch virus polyprotein processing. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 85(10):3391–3395, 1988.
- [154] William G Dougherty, Susan M Cary, and T Dawn Parks. Molecular genetic analysis of a plant virus polyprotein cleavage site: a model. *Virology*, 171(2):356–364, 1989.

- 
- [155] Rachel B Kapust, József Tözsér, Terry D Copeland, and David S Waugh. The p1 specificity of tobacco etch virus protease. *Biochemical and biophysical research communications*, 294(5):949–955, 2002.
- [156] Hervé Minoux and Christophe Chipot. Cation- $\pi$  interactions in proteins: can simple models provide an accurate description? *Journal of the American Chemical Society*, 121(44):10366–10372, 1999.
- [157] P.Y. Bruice. *Organic Chemistry*. Number Bd. 1 in International edition. Pearson/Prentice Hall, 2004.
- [158] J. Heringa and P. Argos. Side-chain clusters in protein structures and their role in protein folding. *J Mol Biol*, 220(1):151–171, Jul 1991.
- [159] M. Schiffer, C. H. Chang, and F. J. Stevens. The functions of tryptophan residues in membrane proteins. *Protein Eng*, 5(3):213–214, Apr 1992.
- [160] A. Chilkoti, P. H. Tan, and P. S. Stayton. Site-directed mutagenesis studies of the high-affinity streptavidin-biotin complex: contributions of tryptophan residues 79, 108, and 120. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92(5):1754–1758, Feb 1995.
- [161] U. Samanta, D. Pal, and P. Chakrabarti. Environment of tryptophan side chains in proteins. *Proteins*, 38(3):288–300, Feb 2000.
- [162] Nikolaj Blom, Thomas Sicheritz-Pontén, Ramneek Gupta, Steen Gammeltoft, and Søren Brunak. Prediction of post-translational glycosylation and phosphorylation of proteins from the amino acid sequence. *Proteomics*, 4(6):1633–1649, Jun 2004.
- [163] Mark Helm and Stefan Wölfl. *Instrumentelle Bioanalytik*. John Wiley & Sons, 2013.
- [164] PH Von Hippel and Th Schleich. The effects of neutral salts on the structure and conformational stability of macromolecules in solution. *Structure and stability of biological macromolecules*, 2:417–574, 1969.
- [165] Srinivasan Damodaran and John E Kinsella. The effects of neutral salts on the stability of macromolecules. a new approach using a protein-ligand binding system. *Journal of Biological Chemistry*, 256(7):3394–3398, 1981.
- [166] RA Curtis, JM Prausnitz, and HW Blanch. Protein-protein and protein-salt interactions in aqueous protein solutions containing concentrated electrolytes. *Biotechnology and bioengineering*, 57(1):11–21, 1998.
- [167] Hubert Rehm and Thomas Letzel. *Der Experimentator: Proteinbiochemie/Proteomics*. Springer-Verlag, 2009.
- [168] Mepur H Ravindranath, Rajeswari MH Ravindranath, Donald L Morton, and Michael C Graves. Factors affecting the fine specificity and sensitivity of serum antiganglioside antibodies in elisa. *Journal of immunological methods*, 169(2):257–272, 1994.

- 
- [169] Friederike Traunmüller, Isabella Haslinger, Heimo Lagler, Graninger Wolfgang, Markus Alexander Zeitlinger, and Haider Abdulla Abdel Salam. Influence of the washing buffer composition on the sensitivity of an enzyme-linked immunosorbent assay using mycobacterial glycolipids as capture antigens. *J Immunoassay Immunochem*, 26(3):179–188, 2005.
- [170] Giacomo Carrea, Gianluca Ottolina, and Sergio Riva. Role of solvents in the control of enzyme selectivity in organic media. *Trends in Biotechnology*, 13(2):63–70, 1995.
- [171] A. M. Klivanov. Why are enzymes less active in organic solvents than in water? *Trends Biotechnol*, 15(3):97–101, Mar 1997.
- [172] C. Mattos and D. Ringe. Proteins in organic solvents. *Curr Opin Struct Biol*, 11(6):761–764, Dec 2001.
- [173] Johannes Buchner and Rainer Rudolph. Renaturation, purification and characterization of recombinant fab-fragments produced in escherichia coli. *Bio/technology* (Nature Publishing Company), 9(2):157–162, 1991.
- [174] Diane L Hevehan and Eliana De Bernardez Clark. Oxidative renaturation of lysozyme at high concentrations. *Biotechnology and bioengineering*, 54(3):221–230, 1997.
- [175] Roman V Rariy and Alexander M Klivanov. Correct protein folding in glycerol. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94(25):13520–13523, 1997.
- [176] Tsutomu Arakawa, Daisuke Ejima, Kouhei Tsumoto, Noriyuki Obeyama, Yoshikazu Tanaka, Yoshiko Kita, and Serge N Timasheff. Suppression of protein interactions by arginine: a proposed mechanism of the arginine effects. *Biophysical chemistry*, 127(1):1–8, 2007.
- [177] T Arakawa, K Tsumoto, Y Kita, B Chang, and D Ejima. Biotechnology applications of amino acids in protein purification and formulations. *Amino acids*, 33(4):587–605, 2007.
- [178] Marc Zimmer. Green fluorescent protein (gfp): applications, structure, and related photophysical behavior. *Chemical reviews*, 102(3):759–782, 2002.
- [179] Marc-André Elsliger, Rebekka M Wachter, George T Hanson, Karen Kallio, and S James Remington. Structural and spectral response of green fluorescent protein variants to changes in ph. *Biochemistry*, 38(17):5296–5301, 1999.
- [180] R. L. Baldwin. How hofmeister ion interactions affect protein stability. *Biophys J*, 71(4):2056–2063, Oct 1996.
- [181] Toshimichi Ikemura. Codon usage and trna content in unicellular and multicellular organisms. *Molecular biology and evolution*, 2(1):13–34, 1985.
- [182] Manolo Gouy and Christian Gautier. Codon usage in bacteria: correlation with gene expressivity. *Nucleic acids research*, 10(22):7055–7074, 1982.
- [183] Michael L Sprengart, E Fuchs, and AG Porter. The downstream box: an efficient and independent translation initiation signal in escherichia coli. *The EMBO journal*, 15(3):665, 1996.

- 
- [184] Guennadi Sezonov, Daniele Joseleau-Petit, and Richard D'Ari. *Escherichia coli* physiology in luria-bertani broth. *Journal of bacteriology*, 189(23):8746–8749, 2007.
- [185] Gregory W Luli and WILLIAM R Strohl. Comparison of growth, acetate production, and acetate inhibition of *escherichia coli* strains in batch and fed-batch fermentations. *Applied and environmental microbiology*, 56(4):1004–1011, 1990.
- [186] YC Chiew, D Kuehner, HW Blanch, and JM Prausnitz. Molecular thermodynamics for salt-induce protein precipitation. *AIChE Journal*, 41(9):2150–2159, 1995.
- [187] Anurag Rathore and Ajoy Velayudhan. Scale-up and optimization in preparative chromatography: principles and biopharmaceutical applications, volume 88. CRC Press, 2002.
- [188] Lior Rosenfeld, Jason Shirian, Yuval Zur, Noam Levaot, Julia M. Shifman, and Niv Papo. Combinatorial and computational approaches to identify interactions of macrophage colony-stimulating factor (m-csf) and its receptor c-fms. *J Biol Chem*, 290(43):26180–26193, Oct 2015.
- [189] Anna R Mäkelä and Christian Oker-Blom. Baculovirus display: a multifunctional technology for gene delivery and eukaryotic library development. *Advances in virus research*, 68:91–112, 2006.
- [190] Sebastian Krause, Dieco Würdemann, Alexander Wentzel, Andreas Christmann, Holger Fehr, Harald Kolmar, and Karlheinz Friedrich. Bacteria displaying interleukin-4 mutants stimulate mammalian cells and reflect the biological activities of variant soluble cytokines. *Chembiochem*, 5(6):804–810, 2004.
- [191] Michael J Feldhaus, Robert W Siegel, Lee K Opresko, James R Coleman, Jane M Weaver Feldhaus, Yik A Yeung, Jennifer R Cochran, Peter Heinzelman, David Colby, Jeffrey Swers, et al. Flow-cytometric isolation of human antibodies from a nonimmune *saccharomyces cerevisiae* surface display library. *Nature biotechnology*, 21(2):163–170, 2003.
- [192] Yves Durocher, Sylvie Perret, and Amine Kamen. High-level and high-throughput recombinant protein production by transient transfection of suspension-growing human 293-ebna1 cells. *Nucleic Acids Res*, 30(2):E9, Jan 2002.
- [193] Irwin Chen and Alice Y Ting. Site-specific labeling of proteins with small molecules in live cells. *Current opinion in biotechnology*, 16(1):35–40, 2005.
- [194] Marlon J Hinner and Kai Johnsson. How to obtain labeled proteins and what to do with them. *Current opinion in biotechnology*, 21(6):766–776, 2010.
- [195] Georgeta Crivat and Justin W. Taraska. Imaging proteins inside cells with fluorescent tags. *Trends Biotechnol*, 30(1):8–16, Jan 2012.
- [196] Antje Keppler, Susanne Gendreizig, Thomas Gronemeyer, Horst Pick, Horst Vogel, and Kai Johnsson. A general method for the covalent labeling of fusion proteins with small molecules in vivo. *Nature biotechnology*, 21(1):86–89, 2003.



- 
- [197] Arnaud Gautier, Alexandre Juillerat, Christian Heinis, Ivan Reis Corrêa, Maik Kindermann, Florent Beaufils, and Kai Johnsson. An engineered protein tag for multiprotein labeling in living cells. *Chemistry & biology*, 15(2):128–136, 2008.
- [198] Georgyi V. Los and Keith Wood. The halotag: a novel technology for cell imaging and protein analysis. *Methods Mol Biol*, 356:195–208, 2007.
- [199] Sarah S. Gallagher, Julia E. Sable, Michael P. Sheetz, and Virginia W. Cornish. An in vivo covalent tmp-tag based on proximity-induced reactivity. *ACS Chem Biol*, 4(7):547–556, Jul 2009.
- [200] B Albert Griffin, Stephen R Adams, and Roger Y Tsien. Specific covalent labeling of recombinant protein molecules inside live cells. *Science*, 281(5374):269–272, 1998.
- [201] Brent R. Martin, Ben N G. Giepmans, Stephen R. Adams, and Roger Y. Tsien. Mammalian cell-based optimization of the biarsenical-binding tetracysteine motif for improved fluorescence and affinity. *Nat Biotechnol*, 23(10):1308–1314, Oct 2005.
- [202] Chayasith Uttamapinant, Katharine A. White, Hemanta Baruah, Samuel Thompson, Marta Fernández-Suárez, Sujiet Puthenveetil, and Alice Y. Ting. A fluorophore ligase for site-specific protein labeling inside living cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107(24):10914–10919, Jun 2010.
- [203] Mark Howarth, Keizo Takao, Yasunori Hayashi, and Alice Y Ting. Targeting quantum dots to surface proteins in living cells with biotin ligase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(21):7583–7588, 2005.
- [204] Stephen R Adams, Robert E Campbell, Larry A Gross, Brent R Martin, Grant K Walkup, Yong Yao, Juan Llopis, and Roger Y Tsien. New biarsenical ligands and tetracysteine motifs for protein labeling in vitro and in vivo: synthesis and biological applications. *Journal of the American Chemical Society*, 124(21):6063–6076, 2002.
- [205] Osamu Shimomura, Frank H Johnson, and Yo Saiga. Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, aequorea. *Journal of cellular and comparative physiology*, 59(3):223–239, 1962.
- [206] Richard Hawkes, Evelyn Niday, and Julian Gordon. A dot-immunobinding assay for monoclonal and other antibodies. *Analytical biochemistry*, 119(1):142–147, 1982.
- [207] MS Blake, KH Johnston, GJ Russell-Jones, and EC Gotschlich. A rapid, sensitive method for detection of alkaline phosphatase-conjugated anti-antibody on western blots. *Analytical biochemistry*, 136(1):175–179, 1984.
- [208] Katherine R Frederick, James Tung, Richard S Emerick, Frank R Masiarz, Scott H Chamberlain, Amit Vasavada, Steven Rosenberg, SUMITA Chakraborty, LM Schopfer, and LM Schopfer. Glucose oxidase from aspergillus niger. cloning, gene sequence, secretion from saccharomyces cerevisiae and kinetic analysis of a yeast-derived enzyme. *Journal of Biological Chemistry*, 265(7):3793–3802, 1990.

- 
- [209] Ralf Schoepfer. The prset family of t7 promoter expression vectors for escherichia coli. *Gene*, 124(1):83–85, 1993.
- [210] B. P. Cormack, R. H. Valdivia, and S. Falkow. Facs-optimized mutants of the green fluorescent protein (gfp). *Gene*, 173(1 Spec No):33–38, 1996.
- [211] Hui-wang Ai, Scott G Olenych, Peter Wong, Michael W Davidson, and Robert E Campbell. Hue-shifted monomeric variants of clavularia cyan fluorescent protein: identification of the molecular determinants of color and applications in fluorescence imaging. *BMC biology*, 6(1):1, 2008.

---

## 6 Anhang

---

### 6.1 Abkürzungen

---

ad	lat. zu
aq. dest.	destilliertes Wasser
Arg	Arginin
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
Bp	Basenpaar
BSA	bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
c-fms	Colony stimulating factor 1 receptor
C-terminus	Carboxyterminus
DFG	DMEM + FKS + Gentamycin
DMEM	Dulbeccos Modified Eagles Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	desoxyribonucleic acid / Desoxyribonukleinsäure
ECL	Elektrochemilumineszenz
EL	Elution
engl.	englisch
FACS	Fluorescent-activated Cell Sorting
FH	Fachhochschule
FITC	Fluorescein isothiocyanate
FKS	Fötales Kälberserum
FUS	Fötales Fusionsprotein
fwd	forward
g	Erdbeschleunigung
G-CSF	Granulocyte-colony stimulating factor
GFP	grünfluoreszierendes Protein
ggf.	gegebenenfalls
h	Stunde
h / m	Speziesangaben (h-human / m-murin)
H <sub>2</sub> O	destilliertes Wasser
HEK	human embryonic kidney
HRP	Horseradish peroxydase
IMAC	immobilisierte Metallionen Affinitätschromatographie
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid
kDa	kilo Dalton
i. A.	im Allgemeinen

---

i. d. R.	in der Regel
IEC	ion exchange chromatography / Ionenaustauschchromatographie
Int	intrazellulär
Luc	Luciferase
M-CSF	Macrophage-colony stimulating factor
mAb	Monoclonal antibody / monoklonaler Antikörper
mAu	milli absorbance unit
Mio.	Million
ml	milliliter
mM	millimolar
MWCO	molecular weight cut off
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
nM	nanomolar
N-terminus	Aminotermius
NTP	Nukleosidtriphosphate
LB	lysogeny broth / komplexes Nährmedium
OD <sub>600</sub>	Optische Dichte bei 600nm
ORI	origin of replication / Replikationsursprung
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	Polymerase chain reaction / Polymerasekettenreaktion
pI	isoelektrischer Punkt
Pos.	Position
Prop	Propanol
rcf	relative centrifugal force / Relative Zentrifugalkraft
rev	reverse
rpm	rounds per minute / Umdrehungen pro Minute
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT	Raumtemperatur
RFG	RPMI + FKS + Gentamycin
SDS	Sodium dodecyl sulfate / Natriumlaurylsulfat
SEC	size excusion chromatography / Größenausschlusschromatographie
SP	Signalpeptid
SRF	Standard-Rückfaltung
SV	Säulenvolumen
T4SS	Typ 4 Sekretionssystem
TE	Tris/EDTA
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TEV	Tobacco etch virus / Tabakätzvirus
TFP	teal fluorescent protein / blaugrünfluoreszierendes Protein
TNF $\alpha$	Tumor necrosis factor $\alpha$

---

---

TSLP	Thymic Stromal Lymphopoeitin
TSLPR $\alpha$	Thymic Stromal Lymphopoeitin Rezeptor $\alpha$ -Kette
ü. N.	über Nacht
ÜS	Überstand
Vol.	Volumen
wt	Wildtyp
WB	Western Blot
ZL	Zellysat

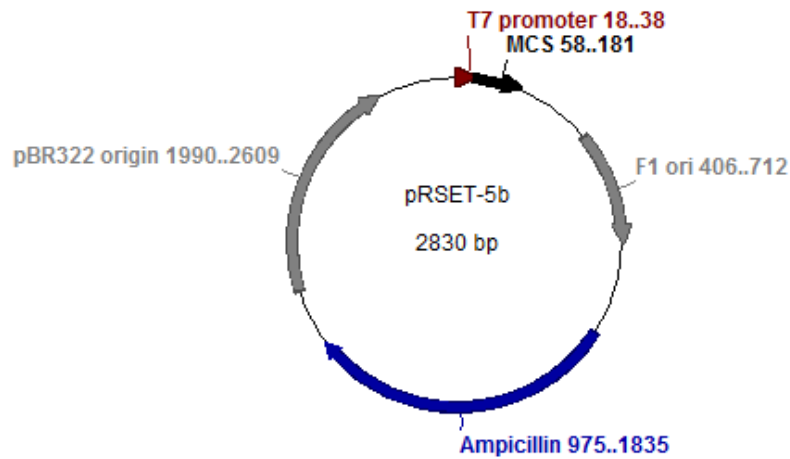


Abbildung 52: Plasmidkarte pRSET-5b [209]. Die verschiedenen Expressionskonstrukte wurden in die MCS kloniert.

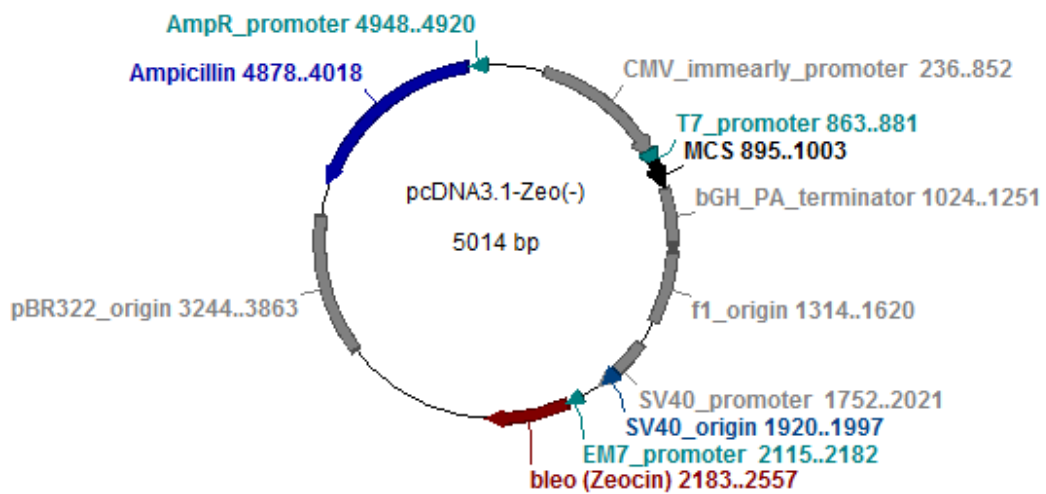


Abbildung 53: Plasmidkarte pcDNA3.1-Zeo(-) (Invitrogen). Die verschiedenen Expressionskonstrukte wurden in die MCS kloniert.

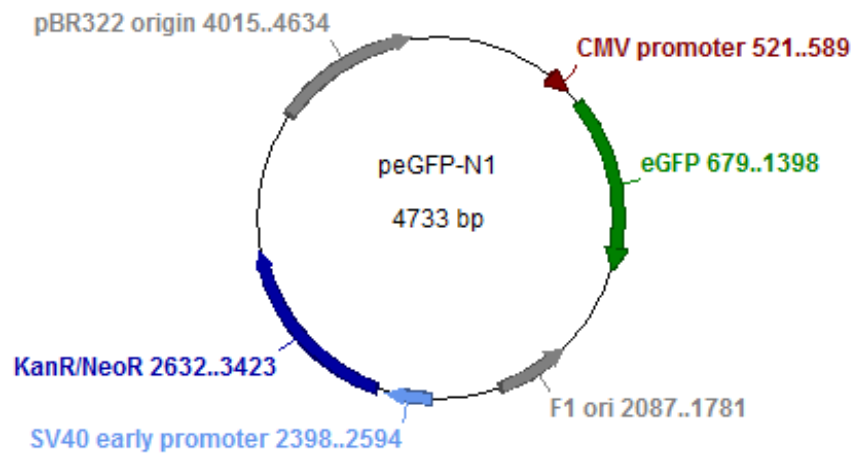


Abbildung 54: Plasmidkarte peGFP-N1 [210]. Die verschiedenen Expressionskonstrukte wurden in die MCS kloniert.

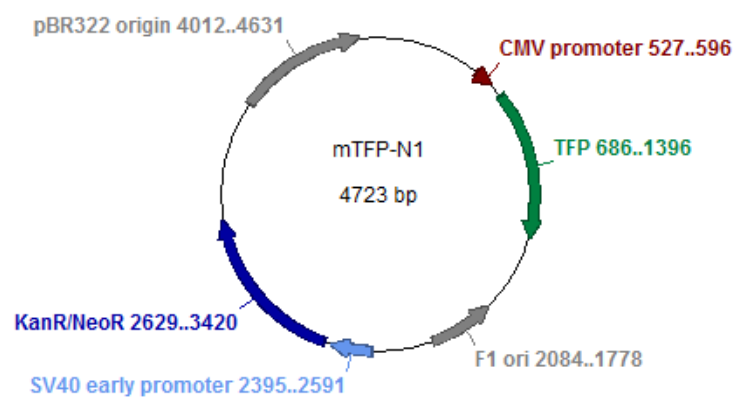


Abbildung 55: Plasmidkarte mTFP-N1 [211]

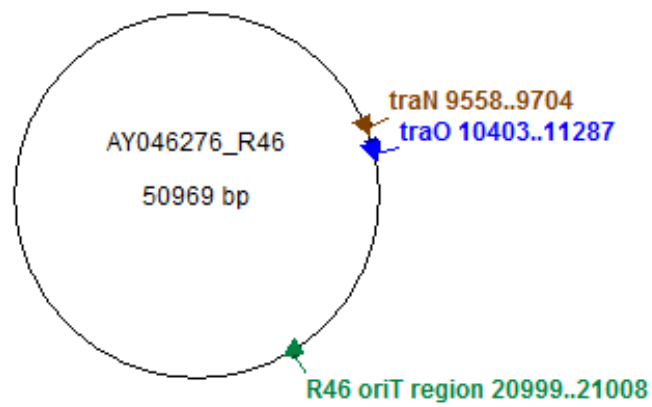


Abbildung 56: Plasmidkarte *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium Plasmid R46 (AY046276). Aus diesem Plasmid wurde pKM101 entwickelt [98]. Für pKM101 wurde keine Karte gefunden.



## 6.3 Primer

Tabelle 13: Die verwendeten Primer, die palindromischen Erkennungssequenzen für Restriktionsenzyme sind unterstrichen.

Name	5'→3'-Sequenz
mMCSF-Disp rev	TAC <u>ACTCGAGT</u> CCGCCGCTGCCGGAGCCTCCAGGCTTGGTCACCACATC
mMCSF-Disp fwd	GAAATGAATCGTCTTGGAAGCCGGGTCCAG <u>GCGGCCGCA</u> AGGAGGTGTCAGAACAC
TraN-P5D4 in fwd	GCCGGTTAACAAGGCCATCCCCGTCGATACCCAGGGGGGCAGAAACGAGAGCCCGGTCCAGGCGGCCCTTACACAGACATCGAA
TraN-P5D4 out fwd	AC <u>GAAATTC</u> ATGAAGGTCCCAGGATCTGGACACAAACCACCTCCTGAACCCGACTGGTCTAATACAGTGCCGGTTAACAAGGCCAT
P5D4-TraN in fwd	CCGGTTAACAAGGCCATCCCCGTCGATACCCAGGGGGGCAGAAACGAGAGCCCGGTCCAG <u>GCGGCCGCA</u> AGGAGGTGTCAGAAC
P5D4-TraN mid fwd	AAAGCCGGGTCCAGGCGGCTCTGGACACAAACCACCTCCTGAACCCGACTGGTCTAATACAGTGCCGGTTAACAAGGCCATC
P5D4-TraN out fwd	AAC <u>GAAATTC</u> ATGAAGGTCCCAGGACCTTACACAGACATCGAAATGAATCGTCTTGGAAGCCGGGTCCAGGCGGCT
mc-FMS TraN fwd	ATCAGGATCCTAGATATCACCATGGAGTTGGGGCCTCCTCT
mc-FMS TraN in rev	AGATGCGGCCGCGGACTCATCGGGGAGCTGCTT
mc-FMS TraN mid rev	TCCGGTCCTGAGCCGCTATGGTGGTGATGATGGTGATGATGGTGATGGCCTGATCCAGATGCGGCCGCGGACTCATC
mc-FMS TraN out rev	GCCCTCTAGACTACGGGATCGCTTTGTTTACTGGAACGGTGTTGCTCCAGTCCGGCTCCGGTCCTGAGCCGCTATG

Tabelle 14: Die verwendeten Primer, die palindromischen Erkennungssequenzen für Restriktionsenzyme sind unterstrichen.

Name	5'→3' - Sequenz
TEV-GFP fwd	TCACGCTAGCGAAAACCTGTATTTTCAGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTT
TraNshortC fwd in	CCAGTAAACAAAACCATCCCCGGGCGGTAGCGGCGCTAGC
TraNfull fwd in	CAGTAAACAAAACCATCCCCGGTTGATACGCAAGGTGGTCGTAATGAATCCGGCGGTAGCGGCGCTAGC
TraNshortC-T21A fwd	TATACATATGCCGGAGCCGGACTGGAGCAACACCGTTCAGTAAACAAAGCGATCCCG
TraNfull-T21A fwd out	TATACATATGAGCGGCCATAAACCGCCACCGGAGCCGGACTGGAGCAACACCGTTCAGTAAACAAAGCGATCCCG
TraNfull-T21A in fwd	CAGTAAACAAAGCGATCCCCGGTTGATACGCAAGGTGGTCGTAATGAATCCGGCGGTAGCGGCGCTAGC
TraNfull out fwd	ATGCATATGAGCGGCCATAAACCGCCACCGGAGCCGGACTGGAGCAACACCGTTCAGTAAACAAAACCATCCCG
TraNshortN out fwd	GTTCCATATGCCGGAGCCGGACTGGAGCAACACCGTTCAGTAAACAAAACCATCCCG
TraNshortC-W12A out fwd	TATACATATGCCGGAGCCGGAGCGGAGCAACACCGTTCAGTAAACAAA
TraNshortC-V12A out fwd	ACATATGCCGGAGCCGGACTGGAGCAACACCGTTCAGCAACAAAACC
TraNfull-P10C fwd	TATACATATGAGCGGCCATAAACCGCCACCGGAGTGCAGCTGGAGCAACA
HIS out rev	AGATCTCGAGAAGCTTAATGGTGATGATGGTGATGGCCTGACCCGAGCCATGGTGATGATGGTGATG
GFP-HIS in rev	TCACTCGAGTTACTAATGGTGATGATGGTGATGCTTGTACAGCTCGTCCATGCC
TraO fwd	TATACATATGAAGCTGAAGCAGACGCTCCTTCAAAGGTT
TraO-S7C fwd	ACGACATATGAAGCTGAAGCAGACGTGCTTCAAAGGTGCGAAGAATATCAGTACGTAATG
TraO-G95C in fwd	GGGCGATAAAGTCGTTTGCGTTTCGTAATA
TraO-G95C in rev	TATTACGAACGCAAACGACTTTATCGCCC
TraOshort rev	GATCCTCGAGAAGCTTACTAATTATTATTACGAACGCCAACG
TraO-SQE in rev	GCCGTACCGGTTTCTACCTGACCGGCGCTCGGCGCGAAATATTATTACG
TraO-SQE mid rev	CCAATTTGAACCTGCGCACATCCGGGGAAGCCGTACCGGTTTCTACCT
TraO rev	CTGCAGATCTTATCAGTTATCCTCGCCAATTTGAACCTGCGCA
TraO Linker in rev	CATGCTAGCACCACTCGGGCTGCCCGGCGCGAAATATTATT
Linker TFP in fwd	CCCGAGTGGTGTAGCATGGTGAGCAAGGGCGAG
TFP Linker in rev	CTTCATGCCACTGCGGCCGCCCTTGTACAGCTCGTCCAT
Linker TraO in fwd	GGCCGCAGTGCCATGAAGCTGAAGCAGACG
TraN-hG-CSF fwd	GGCGCTAGCATCGAAGGTGCGACCCCACTGGGCCCTGCCAG
hG-CSF fwd	ATCACGCTAGCATCGAGGGAAGGACCCCACTGGGCCCTGCCAG
hG-CSF rev	ATCTCGAGCTCGGATCCCTATCAGGGCTGGGCAAGGTG
TraN-hM-CSF fwd	TTCAGCTAGCATCGAGGGTAGAGAGGAAGTTTCCGAGTATTGCTCAC
hM-CSF fwd	TATACATATGGAGGAGGTGTGCGGAGTACTG
hM-CSF rev	ATACAGATCTATTAGCTGCCTTCTGACTGACG
TraN-hFGF-9 fwd	CTCTGCTAGCATCGAGGGAAGGGCTCCCTTAGGTGAAGTT
hFGF-9 fwd	TATACATATGGCTCCCTTAGGTGAAGTT
hFGF-9 rev	TCATCTCGAGTCAACTTTGGCTTAGAATATC
TraN-hTNFa fwd	TTGTGCTAGCGTCAGATCATCTTCTCGAACC
hTNFa rev	AGAACTCGAGTTATCACAGGGCAATGATCCC
FP fwd	AGTACATATGGTGAGCAAGGGCGAGGAG
GFP rev	ACGTAAAGCTTACTTGTACAGCTCGTCCAT

---

## 6.4 Restriktionsenzyme

---

Tabelle 15: Die verwendeten Restriktionsenzyme, die Spaltstellen sind markiert

Enzym	5'→3' - Sequenz
BamHI	G <sup>^</sup> GATCC
BglII	A <sup>^</sup> GATCT
EcoRI	G <sup>^</sup> AATTC
HindIII	A <sup>^</sup> AGCTT
NdeI	CA <sup>^</sup> TATG
NheI	G <sup>^</sup> CTAGC
NotI	GC <sup>^</sup> GGCCGC
XbaI	T <sup>^</sup> CTAGA
XhoI	C <sup>^</sup> TCGAG

## 6.5 Proteineigenschaften

Tabelle 16: Die molaren Extinktionskoeffizienten  $\varepsilon$  und die Molekulargewichte  $M_r$  aller hergestellten rekombinanten Proteine

Protein	$\varepsilon$ [cm <sup>2</sup> / mmol]	$M_r$ [kDa]
TraO-126	1,196	14,2
TraO-SQE	1,184	14,3
TraOshort	1,457	11,6
TraO-S7C	1,182	14,3
TraO-G95C	1,180	14,4
TraNfull-T21A-TEV-GFP-2x6HIS	0,868	33,4
TraNshortNC-W12A-TEV-GFP-2x6HIS	0,742	31,7
TraNshortNC-V18A-TEV-GFP-2x6HIS	0,913	31,8
TraNshortNC-T21A-TEV-GFP-2x6HIS	0,913	31,8
TraNshortNC-TEV-GFP-2x6HIS	0,912	31,8
TraNshortC-TEV-GFP-2x6HIS	0,895	32,4
TraNfull-TEV-GFP-2x6HIS	0,867	33,4
TraNshortN-TEV-GFP-2x6HIS	0,883	32,8
mc-FMSR-HIS-TraNshortNC-T21A	1,553	61,1
hTSLPRa-HIS-TraNshortNC-T21A	2,168	33,4
mM-CSF	0,486	18,2
hM-CSF	0,642	18,4
TraNfull-FX-hM-CSF	0,759	22,8
hTSLP	1,151	15,1
hG-CSF	0,836	18,8
TraNfull-FX-hG-CSF	0,919	23,1
TraO-TFP-TraO	1,188	54,1
hTNF- $\alpha$	1,233	17,5
TraNfull-hTNF- $\alpha$	1,269	21,3
TraNfull-FX-hFGF-9	0,938	27,7

---

## 6.6 DNA-Sequenzen

---

Tabelle 17: Die Accession-Nummern der verwendeten DNA aus UNIPROT bzw. NCBI

Protein	Accession
TraO	Q46704
TraN	Q46702
mc-FMSR	P09581
hTSLPRa	Q9HC73
hIL4Ra	P24394
mM-CSF	P07141
hM-CSF	NP_757350
hTSLP	Q969D9.1
hG-CSF	NP_757373
hTNF-a	P01375
hFGF-9	P31371
mTFP	ABG77397.1
eGFP	AAY25376.1

[illegible]

**TraNfull-TEV-GFP-HIS:**

```
1>ATGAGCGGCCATAAACCGCCACGGAGCGGAGCTGGAGCAACACCGCTTCCAGTAACAAACAAACCATCCCGGTTGATACGCAAGGTGGTCTGAATGAATCCG>100
101>CGGGTAGCGGGCGCTAGCGAAACCTGTATTTCAGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTCAACGGGGTGGTGCCATCTCTGTCAGCTGAGCAGCGGCAGCTAAA>200
201>CGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCCTGAAGTTCATCTGCACCCACCGGCAAGCTGCCCGTGCCC>300
301>TGGCCCCACCTCTGCGACCACTGACCTACCGGCGTGCAAGTGTCTCAGCCGCTACCCCGACCATGAAGCAGCAGACTCTCTCAAGTGGACCGTCCGCC>400
401>AAGGCTACGTCAGGAGGCGACCACTCTCTTCAAGGACGACGGCACTACAAGAACCCGGCGCGAGGTGAAGTTCGAGAGGCGACCACTGTTGAACCGCAT>500
501>CGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACACAGCCCAACGCTCTATATCATGGCCGACAAG>600
601>CAGAGAGAGCGGGCATCAAGGTGAATCTCAAGATCCGCCACAACATCAGGAGCGGCGAGCTGACGCTCGCCGACCATACCGCAGAAACCCCATCGGGC>700
701>ACGGCCCGGTGCTGCTGCGCCGACAACACTACCTGAGCACCCAGTCCGCGCTGAGCAAGAGACCCCAAGCAGAGAAGCGATCAGTGTCTCTGTGGAGT>800
801>CGTGACCGCGCGGGATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGCATCACCATCATCACCATGGCTCGGGTCAGGCCATCACCATCATCACCATTAA>900
```

TraNfull      Linker      Restriktionsspaltstelle      TEV-Spaltstelle      GFP      Polyhistidin

```

TranFull:      1>ATGAGCGGCCATAAAACCGCCACCGGAGCCGGACTGGAGCAACACCGTTCCAGTAAACAAAACCATCCCGGTTGATACGCAAGGTGGTCTGAATGAATCC>99
TranFull-T21A: 1>ATGAGCGGCCATAAAACCGCCACCGGAGCCGGACTGGAGCAACACCGTTCCAGTAAACAAAACCATCCCGGTTGATACGCAAGGTGGTCTGAATGAATCC>99
TranShortN:    1>ATG- - - - - CCGGAGCCGGACTGGAGCAACACCGTTCCAGTAAACAAAACCATCCCGGTTGATACGCAAGGTGGTCTGAATGAATCC>81
TranShortC:    1>ATGAGCGGCCATAAAACCGCCACCGGAGCCGGACTGGAGCAACACCGTTCCAGTAAACAAAACCATCCCG- - - - ->69
TranShortNC:    1>ATG- - - - - CCGGAGCCGGACTGGAGCAACACCGTTCCAGTAAACAAAACCATCCCG- - - - ->51
TranShortNC-W12A: 1>ATG- - - - - CCGGAGCGCGAGCGGAGCAACACCGTTCCAGTAAACAAAACCATCCCG- - - - ->51
TranShortNC-V19A: 1>ATG- - - - - CCGGAGCCGGACTGGAGCAACACCGTTCCAGCGAAAACAAAACCATCCCG- - - - ->51
TranShortNC-T21A: 1>ATG- - - - - CCGGAGCCGGACTGGAGCAACACCGTTCCAGTAAACAAAACGATCCCG- - - - ->51

```



**hM-CSF:** 1>ATGGAGGAGGTGTGCGGAGTACTGTAGCCACATGATTGGGAGTGGACACCTGCAGTCTCTGCAGCGGCTGATTGACAGTCAGATGGAGACCTCGTGCCAAA>100  
101>TTACATTGTAGTTTGTAGACCAGGAACAGTTGAAAGATCCAGTGTGCTACCTTAAGAAGGCATTCTCCTGGTACAAGACATAATGGAGGACACCATGCG>200  
201>CTTCAGAGATAACACCCCAATGCCATCGCCATTGTGCAGCTGCAGGAATCTCTTTGAGGCTGAAGAGCTGCTTCACCAAGGATTATGAAGAGCATGAC>300  
301>AAGGCCTGCGTCCGAACCTTCTATGAGACACCTCTCCAGTTGCTGGAGAAGGTCAAGAATGTCTTTAATGAAACAAAAGATCTCCTTGAACAGGACTGGA>400  
401>ATATTTTCAGCAAGAAGTCAACAACAGCTTTGCTGAATGCTCCAGCCAAGGCCATGAGAGGCAGTCCGAGGGATCTCTAA>480

**hG-CSF:** 1>GACCCCACTGGGCGCTGCCAGCTCCCTGCCCCAGAGCTTCCTGCTCAAGTGCTTAGAGCAAGTGAGGAAGATCCAGGGCGATGGCGCAGCGCTCCAGGAG>100  
101>AAGCTGTGTGCCACCTACAAGCTGTGCCACCCGAGGAGCTGGTGTGCTCGGACACTCTCTGGGCATCCCTGGGCTCCCTGAGCAGCTGCCCCAGCC>200  
201>AGGCCCTGCAGCTGGCAGGCTGCTTGAGCCAACTCCATAGCGGCTTTTCTCTACAGGGGCTCCTGCAGGGCTGGAAGGGATCTCCCCGAGTTGGG>300  
301>TCCACCTTTGGACACACTGCAGCTGGACGTGCGCGACTTTGCCACCACCATCTGSCAGCAGATGGAAGAAGTGGGAATGGCCCTGCGCTGCAGCCACC>400  
401>CAGGGTGCCATGCGGCGCTTCGCTCTGCTTTCCAGCGCCGGGAGGAGGGTCTGTTGCTCCCATCTGCAGAGCTTCCTGGAGGTGTGCTACCGCG>500  
501>TTCTACGCCACCTTGCCAGCCCTGA>528

**hFGF-9:** 1>GGCTCCCTTAGGTGAAGTTGGGAATATTTCCGTTGTGCAGGATGCGGTACCGTTTGGGAATGTGCCGTTGTGCCGTTGGACAGCCCGTTTGTAAAGT>100  
101>GACCACCTGGGTGAGTCCGAAGCAGGGGGCTCCCCAGGGGACCGCAGTCACGAGCTTGGATCATTAAAGGGGATTCTCAGGCGGAGGCAGCTATATC>200  
201>GCAGGACTGGATTTCACTTAGAAATCTTCCCAATGGTACTATCCAGGGAACAGGAAAGACCACAGCCGATTGGCATTCTGGAATTTATCAGTATAGC>300  
301>AGTGGGCTGGTGCAGATTGAGGCGTGGACAGTGGACTCTACCTCGGGATGAATGAGAAGGGGGAGCTGTATGGATCAGAAAACTAACCCAGAGTGT>400  
401>GTATTCAGAGAACAGTTTGAAGAAAAGTGGTATAATACGTACTCGTCAAACTATATAAGCACGTGGACACTGGAAGGCATATACTATGTGCAATAATA>500  
501>AAGATGGGACCCGAGAGAAGGAGTGGAGCTAAACGGCACCAGAAATTCACACATTTTTTACCTAGACAGTGGACCCCGACAAAGTACCTGAATGTA>600  
601>TAAGGATATTCTAAGCCAAAGTTGA>627

**hTNFa:** 1>GTCAGATCATCTTCTCGAACCCCGAGTGACAAGCCTGTAGCCCATGTTGTAGCAAAACCTCAAGCTGAGGGGCAGCTCCAGTGGCTGAACCGCGGGGCA>100  
101>ATGCCCTCCTGGCCAATGGCGTGGAGCTGAGAGATAACAGCTGGTGGTGCCATCAGAGGGCTGTACCTCATCTACTCCAGGTCTCTTCAAGGGCCA>200  
201>AGGCTGCCCTCCACCCATGTGCTCCTCACCCACACCATCAGCCGATCGCCGCTCTCTACAGACCAAGGTCAACCTCCTCTCTGCCATCAAGAGCCCC>300  
301>TGCCAGAGGGAGACCCGAGGGGGCTGAGGCCAAGCCCTGGTATGAGCCCATCTATCTGGAGGGGTCTTCAGCTGGAGAAGGGTGACCGACTCAGCG>400  
401>CTGAGATCAATCGGCCGACTATCTCGACTTTGCCAGTCTGGGAGGTCTACTTTGGGATCATTGCCCTGTGA>477

Abbildung 60: Die DNA-Sequenzen der ungelabelten Zytokine. Siehe 3.3.5

**TraNfull-FX-hM-CSF:** 1>ATGAGCGGCCATAAACCGCCACCGGAGCGGAGTGGAGCAACACCGTTCCAGTAAACAAAACCATCCCGGTTGATACGCAAGGTGGTTCGTAATGAATCCG>100  
101>GCGGTAGCGGCGCTAGCATCGAGGGAAGGGAGGAGGTGTGCGAGTACTGTAGCCACATGATTGGGAGTGGACACCTGCAGTCTCTGCAGCGGCTGATTGA>200  
201>CAGTCAGATGGAGACCTCGTGCCAAATACATTTGAGTTTGTAGACCAGGAACAGTTGAAAGATCCAGTGTGCTACCTTAAGAAGGCATTCTCCTGGTA>300  
301>CAAGACATAATGGAGGACACCATGCGCTTTCAGAGATAACACCCCAATGCCATCGCCATTGTGCAGCTGCAGGAACCTCTCTTTGAGGCTGAAGAGCTGCT>400  
401>TCACCAAGGATTATGAAGAGCATGACAAGGCCTGCGTCCGAACCTTCTATGAGACACCTCTCCAGTTGCTGGAGAAGGTCAAGAATGTCTTTAATGAAAC>500  
501>AAAGAATCTCCTTGACAAGGACTGGAATATTTTTCAGCAAGAAGTCAACAACAGCTTTGCTGAATGCTCCAGCCAAGGCCATGAGAGGCAGTCCGAGGGA>600  
601>TCTCTAA>606

**TraNfull-FX-hG-CSF:** 1>ATGAGCGGCCATAAACCGCCACCGGAGCGGAGTGGAGCAACACCGTTCCAGTAAACAAAACCATCCCGGTTGATACGCAAGGTGGTTCGTAATGAATCCG>100  
101>GCGGTAGCGGCGCTAGCATCGAGGGAAGGACCCCACTGGGCCCTGCCAGTCCCTGCCCCAGAGCTTCTGCTCAAGTGCCTTAGAGCAAGTGAGGAAGAT>200  
201>CCAGGGCGATGGCGCAGCTCCAGGAGAAGCTGTGTGCCACCTACAAGCTGTGCCACCCCGAGGAGCTGGTGTGCTCGGACACTCTCTGGGCATCCCC>300  
301>TGGGCTCCCTGAGCAGCTGCCCCAGCCAGGCCCTGCAGCTGGCAGGCTGCTTGAGCCAACTCCATAGCGGCTTTTCTCTACAGGGGCTCCTGCAGG>400  
401>CCCTGGAAGGGATCTCCCCGAGTTGGGTCCACCTTGGACACATGCAGCTGGACGTCGCCGACTTTGCCACCACCATCTGGCAGCAGATGGAAGAAT>500  
501>GGGAATGGCCCTGCGCTGCAGCCACCCAGGCTGCCATGCCGCGCTTCGCTTCTGCTTTCCAGCGCCGGGAGGAGGGGTCTGTTGCTCCCATCTG>600  
601>CAGAGCTTCTGGAGGTGTGCTACCGGCTTCTACGCCACCTTGCCAGCCCTGA>654

**TraNfull-FX-hFGF-9:** 1>ATGAGCGGCCATAAACCGCCACCGGAGCGGAGTGGAGCAACACCGTTCCAGTAAACAAAACCATCCCGGTTGATACGCAAGGTGGTTCGTAATGAATCCG>100  
101>GCGGTAGCGGCGCTAGCATCGAGGGAAGGGCTCCCTTAGGTGAAGTTGGGAATATTTCCGTTGTGCAGGATGCGGTACCGTTTGGGAATGTGCCCGTGT>200  
201>GCGGTTGGACAGCCCGGTTTGTAAAGTGAACACCTGGGTGAGTCCGAAGCAGGGGGGCTCCCGAGGGGACCCGAGTCACGGAATGGATCATTAAAG>300  
301>GGGATTCTCAGGCGGAGGCAGCTATACTGCAGGACTGGATTCTACTTAGAAATCTTCCCAATGGTACTATCCAGGGAACAGGAAGACCACAGCCGAT>400  
401>TTGGCATTCTGGAATTTATCAGTATAGCAGTGGGCTGGTGCAGCATTGAGGCGTGGACAGTGGACTCTACCTCGGGATGAATGAGAAGGGGAGCTGTA>500  
501>TGGATCAGAAAACTAACCCAGAGTGTGTATTGAGAGAAGTTCGAAGAAAACTGGTATAATACGTACTCTGCAACCTATATAAGCACGTGGACACT>600  
601>GGAAGGCGATACTATGTTGCAATAAATAAGATGGGACCCGAGAGAAGGAGTGGAGTAAACGGCACCCAGAAATTCACACATTTTTTACCTAGACCAG>700  
701>TGGACCCCGACAAAGTACCTGAACGTATAAGGATATTCTAAGCCAAAGTTGA>753

**TraNfull-hTNFa:** 1>ATGAGCGGCCATAAACCGCCACCGGAGCGGAGTGGAGCAACACCGTTCCAGTAAACAAAACCATCCCGGTTGATACGCAAGGTGGTTCGTAATGAATCCG>100  
101>GCGGTAGCGGCGCTAGCATCGAGGGAAGGGCTCCCTTAGGTGAAGTTGGGAATATTTCCGTTGTGCAGGATGCGGTACCGTTTGGGAATGTGCCCGTGT>200  
201>GCTGAACCGCGGGGCAATGCCCTCCTGGCCAATGGCGTGGAGCTGAGAGATAACAGCTGGTGGTGCCATCAGAGGGCTGTACCTCATCTACTCCCAG>300  
301>GTCTCTTCAAGGGCCAAAGGCTGCCCTCCACCCATGTGCTCCTCACCCACACCATCAGCCGATCGCGCTCTCTACAGACCAAGGTCAACCTCCTCT>400  
401>CTGCCATCAAGAGCCCTGCCAGAGGAGACCCAGAGGGGCTGAGGCCAAGCCCTGGTATGAGCCATCTATCTGGGAGGGGTCTTCAGAGTGGAGAA>500  
501>GGGTGACCGACTCAGCGCTGAGATCAATCGGCCGACTATCTCGACTTTGCCAGTCTGGGAGGTCTACTTTGGGATCATTGCCCTGTGA>591

TraNfull      Linker      Restriktionsspaltstelle      TEV-Spaltstelle

Abbildung 61: Die DNA-Sequenzen der TraN-markierten Zytokine. Siehe 3.3.5

hTSLP $\alpha$ -TraN:

```

1>ATGGGGTGGCTTIGCTCTGGGCTCCTGTTCCCTGTGAGCTGCTGGTCTGCTGCAGGTGGCAAGCTCTGGGAACGAATTCATGAAGGTCCCAGGACCTT>100
101>ACACAGACATCGAAATGAATCGTCTTGGAAAGCCGGGTCCACTCGAGCAAGGAGGAGCAGCAGAAGGAGTACAGATTGAGTCTACTTCAATTTAGA>200
201>AACCGTGCAGGTGACATGGAATGCCAGCAAATACTCCAGGACCAACCTGACTTTCCACTACAGATTCAACGGTGATGAGGCCTATGACCAAGTGCACCAAC>300
301>TACCTTCTCCAGGAAGTCACTCTCGGGGTGCCTCCTAGACGCAGAGCAGCAGACGACATTCTCTATTCTCCATCAGGAATGGGACGACCCCGTTT>400
401>TCACCGCAAGTGCCTGGATGGTTTATTACCTGAAACCCAGTTCCTCCGAAGCAGTGTGAGATTTTCGTGGCATCAGGATGCAGTGACGGTGACGTGTTCTGA>500
501>CCTGTCTTACGGGGATCTCCTCTATGAGGTTCACTACCGGAGCCCTTCGACACCGAGTGGCAGTCCAAACAGGAAAATACCTGCAACGTCACCATAGAA>600
601>GGCTTGGATGCCGAGAAGTGTACTCTTCTGGGTGAGGTGAAGGCTATGGAGGATGTATATGGCCAGACATACCCAAGCGACTGGTCAGAGGTGA>700
701>CATGCTGGCAGAGAGGCGAGATTGCGGATGCCTGTGCAGAGACCAACGCCTCCCAAACCAAAGCTGTCCAAAGCGGCCGATCTGGATCAGGCCATCA>800
801>CCATCATCACCATCATCACCACCATAGCGGCTCAGGACCGGAGCCGACTGGAGCAACACCGTTCCAGTAAACAAAGCGATCCCGTAG>100

```

hIL4 $\alpha$ -Signalpeptid      P5D4-Tag      Linker      Polyhistidin      TraNshortNC      hTSLP $\alpha$ -Extrazelluläre Domäne  
Restriktionsspaltstellen

Abbildung 62: Die DNA-Sequenz der TraN-markierten hTSLP-Rezeptor  $\alpha$ -Kette. Siehe 3.4.1

m-cFMSR-TraN:

```

1>ATGGAGTTGGGGCTCTCTGGTCTGCTGCTGGCCACAGTTTGGCATGGTCAGGGGGCCCCCTGTCTCGAGCCTAGTGGCCAGAACTGGTTGTAGAGC>100
101>CGGGTGAAACGGTGACCCTGCGATGTGTGAGCAATGGCAGTGTGGAATGGGATGGCCCCATCTCTCCCTACTGGACCTTGGACCTGAATCTCCCGGAAG>200
201>CACCCTGACCACAAGAAACGGGACCTTCAAAAACACTGGGACCTACCGTTGTACCGAGCTTGAAGACCCCATGGCAGGCAGTACCACCATCCACTTGTAT>300
301>GTCAAAGATCCGGCCCACTCTTGGAAATTTGCTGGCACAGGAGGTGACAGTGGTTGAGGGCCAGGAAGCTGTGCTGCCCTGTCTGATCACTGACCCGTGCAC>400
401>TGAAGGACAGTGTCTCACTGATGCGTGAGGGGGGCAGGAGGTCTTACGCAAAACGGTCTACTTCTTCTGCCATGGCAGGGTTCAATTATCCGCAAGGC>500
501>TAAAGTCCTTGACAGCAATACCTACGTGTGCAAGACCATGGTGAATGGTAGGGAATCCACCTCCACTGGCATCTGGCTTAAGGTGAATCGAGTCCACCCA>600
601>GAGCCCCCAGATAAAATTGGAGCCTAGCAAGCTGGTGCGGATTTCGAGGGGAGGCTGCGCAGATCGTGTGCTCGGCCACTAACGCCGAAGTGGGATTCA>700
701>ACGTTATCTCTCAAACGTGGAGACACCAAGCTGGAATCCCCCTAAACAGTGACTTCCAAGATAACTATTATAAAAAAGTCCGGGCTCTCAGTCTCAACGC>800
801>TGTGGACTTCCAAGACGCTGGCATAATTTCTGTGTGGCCAGCAATGATGTTGGCACACGCACGGCCACCATGAACCTTCCAGGTGGTGAGAGTGCCTAC>900
901>TTAAACTTGACCTCTGAGCAGAGCCTCTTGCAAGGAGGTGTCTGTGGGTGACAGCCTCATCCTCACGGTCCATGCAGATGCCTACCCCTAGCATACAGCATT>1000
1001>ACAACCTGGACCTACCTAGGTCCATTCTTTGAAGACCAGCGCAAGCTTGAGTTTATACCCAAAGGGCCATATACAGGTACACATTCAAGCTCTTTCTGAA>1100
1101>CCGTGTAAAGGCCTCAGAGGCGGGCCAGTACTTCTTAATGGCACAACCAAGGCAGGCTGGAATAATCTGACCTTTGAGCTCACCTGCGATATCCCCCA>1200
1201>GAGGTCAGTGTTACATGGATGCCTGTGAATGGCTCTGATGTCCTGTTCTGTGACGCTCTGGGTACCCTCAGCCCAGCGTGACATGGATGGAGTGACAGGG>1300
1301>GCCACACCGATAGGTGTGATGAAGCCAGGCTTTGCAGGTTTGAATGACACCCACCTGAAGTCCTGAGTCAGAAGCCCTTCGACAAAGTGATCATTCA>1400
1401>GAGCCAGCTGCCATTGGGACCTTAAACACAAACATGACTTATTTTGCAAAACCCACAACAGTGTGGGTAACAGCTCTCAGTACTTCAGGGCCGTCTCC>1500
1501>CTAGGACAAAGCAAGCAGCTCCCGATGAGTCCCGCGCCGATCTGGATCAGGCCATCACCATCATCACCATCATCACCACCATAGCGGCTCAGGACCG>1600
1601>AGCCGGACTGGAGCAACACCGTTCCAGTAAACAAAGCGATCCCGTAG>1647

```

hIL4 $\alpha$ -Signalpeptid      Linker      Polyhistidin      TraNshortNC      m-cFMSR-Extrazelluläre Domäne      Restriktionsspaltstelle

Abbildung 63: Die DNA-Sequenz des TraN-markierten mc-FMS-Rezeptors. Siehe 3.4.1



**P5D4-mM-CSF:**

```

1>ATGGGGTGGCTTTGCTCTGGGCTCCTGTTCCCTGTGAGCTGCCTGGTCTGCTGCAGGTGGCAAGCTCTGGGAACGAATTCATGAAGGTCCCAGGACCTT>100
101>ACACAGACATCGAAATGAATCGTCTTGGAAAGCCGGGTCCAGGCGGCCGCAAGGAGGTGTGAGAACACTGTAGCCACATGATTGGGAATGGACACCTGAA>200
201>GGTCTGACAGCAGTTGATCGACAGTCAAATGGAGACTTCATGCCAGATTGCCTTTGAATTTGTAGACCAGGAACAGCTGGATGATCCTGTTTGCTACCTA>300
301>AAGAAGGCCTTTTTCTGGTACAAGACATAATAGATGAGACCATGCGCTTTAAAGACAACACCCCCAATGCTAACGCCACCGAGAGGCTCCAGGAACTCT>400
401>CCAATAACCTGAACAGCTGCTTCACCAAGGACTATGAGGAGCAGAACAAAGGCTGTGTCCGAACCTTCCATGAGACTCCTCTCCAGCTGCTGGAGAAGAT>500
501>CAAGAACTTCTTTAATGAAACAAAGAATCTCCTTGAAAAGGACTGGAACATTTTACCAGAAGCTGCAACAACAGCTTTGCTAAGTGCTCTAGCCGAGAT>600
601>GTGGTGACCAAGCCTGGAGGCTCCGGCAGCGCGGACTCGAGCTCCTGCTGGGCGTCAGCGTTTCTGCAATTGTCATCTCGGCCGCTGCGCTGTTGTGCT>700
701>ATGTCAGCATCACCAAGATTAGAAAATAG>729

```

**P5D4-TraNfull-T21A-mM-CSF:**

```

1>ATGGGGTGGCTTTGCTCTGGGCTCCTGTTCCCTGTGAGCTGCCTGGTCTGCTGCAGGTGGCAAGCTCTGGGAACGAATTCATGAAGGTCCCAGGACCTT>100
101>ACACAGACATCGAAATGAATCGTCTTGGAAAGCCGGGTCCAGGCGGCCGCTCTGGACACAAACCACCTCCTGAACCCGACTGGTCTAATACAGTGCCGGT>200
201>TAACAAGGCCATCCCGTCGATACCCAGGGGGGCAGAAACGAGAGCCCGGGTCCAGGCGGCCGCAAGGAGGTGTCAGAACACTGTAGCCACATGATTGGG>300
301>AATGGACACCTGAAGGTCTGACAGCAGTTGATCGACAGTCAAATGGAGACTTCATGCCAGATTGCCTTTGAATTTGTAGACCAGGAACAGCTGGATGATC>400
401>CTGTTTGCTACCTAAAGAAGGCCTTTTTCTGGTACAAGACATAATAGATGAGACCATGCGCTTTAAAGACAACACCCCCAATGCTAACGCCACCGAGAG>500
501>GCTCCAGGAACCTCCAATAACCTGAACAGCTGCTTCACCAAGGACTATGAGGAGCAGAACAAAGGCCTGTGTCCGAACCTTCCATGAGACTCCTCTCCAG>600
601>CTGCTGGAGAAGATCAAGAATCTTTAATGAAACAAAGAATCTCCTTGAAAAGGACTGGAACATTTTACCAGAAGCTGCAACAACAGCTTTGCTAAGT>700
701>GCTCTAGCCGAGATGTGGTGACCAAGCCTGGAGGCTCCGGCAGCGCGGACTCGAGCTCCTGCTGGGCGTCAGCGTTTCTGCAATTGTCATCTGGCCGT>800
801>CTGCCTGTTGTGCTATGTGAGCATCACCAAGATTAGAAAATAG>840

```

**TraNfull-T21A-P5D4-mM-CSF:**

```

1>ATGGGGTGGCTTTGCTCTGGGCTCCTGTTCCCTGTGAGCTGCCTGGTCTGCTGCAGGTGGCAAGCTCTGGGAACGAATTCATGAAGGTCCCAGGACCTT>100
101>CTGGACACAAACCACCTCCTGAACCCGACTGGTCTAATACAGTGCCGGTTAACAAGGCCATCCCGTCGATACCCAGGGGGGCAGAAACGAGAGCCCGCC>100
201>GGGTCCAGGCGGCCGCTACACAGACATCGAAATGAATCGTCTTGGAAAGGGTCCAGGCGGCCGCAAGGAGGTGTCAGAACACTGTAGCCACATGATTGGG>300
301>AATGGACACCTGAAGGTCTGACAGCAGTTGATCGACAGTCAAATGGAGACTTCATGCCAGATTGCCTTTGAATTTGTAGACCAGGAACAGCTGGATGATC>400
401>CTGTTTGCTACCTAAAGAAGGCCTTTTTCTGGTACAAGACATAATAGATGAGACCATGCGCTTTAAAGACAACACCCCCAATGCTAACGCCACCGAGAG>500
501>GCTCCAGGAACCTCCAATAACCTGAACAGCTGCTTCACCAAGGACTATGAGGAGCAGAACAAAGGCCTGTGTCCGAACCTTCCATGAGACTCCTCTCCAG>600
601>CTGCTGGAGAAGATCAAGAATCTTTAATGAAACAAAGAATCTCCTTGAAAAGGACTGGAACATTTTACCAGAAGCTGCAACAACAGCTTTGCTAAGT>700
701>GCTCTAGCCGAGATGTGGTGACCAAGCCTGGAGGCTCCGGCAGCGCGGACTCGAGCTCCTGCTGGGCGTCAGCGTTTCTGCAATTGTCATCTGGCCGT>800
801>CTGCCTGTTGTGCTATGTGAGCATCACCAAGATTAGAAAATAG>840

```

hIL4Ra-Signalpeptid      Linker      P5D4-Epitoptag      mM-CSF      TraNfull-T21A  
hIL4Ra-Transmembran- und intrazelluläre Domäne      Restriktionsspaltstelle

Abbildung 64: Die DNA-Sequenzen der verschiedenen TraNshortNC-T21A-markierten Zytokine für die Expression auf HEK293T-Zellen. Siehe 3.4.3

---

## 6.7 Danksagung

---

Die angefertigte Arbeit wurde zum größten Teil in den Laboren der Firmen Invigate GmbH und Eurobiosciences GmbH sowie am Institut für Biochemie II am Universitätsklinikum Jena angefertigt. Bei allen Wegbegleitern und Unterstützern dieser Arbeit möchte ich mich herzlichst bedanken.

Dr. Sebastian Krause (Invigate GmbH) gebührt mein größter Dank. Er hat mich im Rahmen der Promotionsarbeit fachlich unterstützt, Vertrauen in mich gesetzt und stand mir immer mit Rat und Inspiration zur Seite. Er vermittelte mir maßgeblich die Grundsätze wissenschaftlichen Arbeitens und Schreibens, die mich in meiner weiteren beruflichen Laufbahn begleiten werden.

Die Betreuung der Promotion erfolgte durch Prof. Dr. Harald Kolmar von der Technischen Universität Darmstadt. Bei ihm möchte ich mich für das Vertrauen bedanken, was er in mich gelegt hat, als er mir die Durchführung einer Promotion in seiner Arbeitsgruppe ermöglicht hat.

Prof. Dr. Karlheinz Friedrich als Leiter der Arbeitsgruppe Signaltransduktion des Institutes für Biochemie II für die fachliche Unterstützung, die Zusammenarbeit und die damit verbundene Nutzung der universitären Labore.

Der Firma Invigate GmbH danke ich für die umfangreiche Zurverfügungstellung von Materialien.

Ich danke den Mitarbeitern der Firmen Invigate GmbH und ImmunoTools GmbH für das Wissen über die rekombinante Herstellung von Proteinen, den Mitarbeitern der Universität Jena, Institut für Biochemie II für allgemeinen Rat und Tat, besonders die Hilfe bei Versuchen zur Oberflächenfärbung von Zellen und den Aktivitätsassays.

Das Wichtigste zum Durchführen einer solch langen Arbeit ist eine gute Arbeitsatmosphäre im Labor. Diese wurde mir geschaffen durch viele Kollegen in Jena, ihnen gilt mein Dank dafür. Besonderer Dank gilt dabei den langjährigen Begleitern AWO, Boro, Susi, Monique, Maria, Melissa, Jens, Steffi, Kritan, Iva und Andrey. Die Gespräche mit ihnen, der fachliche Austausch, die guten Tipps, Ratschläge, Ideen und Hilfestellungen ermöglichten den Fortgang der Projekte und gelegentlichen Schlaf.

Ich möchte mich auch bei meinen Freunden bedanken, welche mich außerhalb des Labors unterstützt haben. Besonderen Dank möchte ich dabei MaFi aussprechen, die mich trotz weiter Ferne sehr unterstützt hat.

Nicht zuletzt gilt der Dank meinen Eltern und meiner Familie, die mich auf unterschiedlichsten Ebenen unterstützt und mich stets voller Vertrauen in meine Wege bis hierher begleitet haben.



---

## 6.8 Lebenslauf

---

Name	Matthias Schirmer
Anschrift	Camsdorfer Ufer 2 07749 Jena
Geburtsdatum und -ort	09. Februar 1982 in Leipzig
Familienstand	ledig
Schulbildung und Studium	
1988 - 1992	Adam-Kuckhoff-Schule Leipzig
1992 - 1998	Sportgymnasium Leipzig
1998 - 1999	Cox High School Virginia Beach, VA (USA)
1999 - 2001	allgemeine Hochschulreife am Immanuel-Kant-Gymnasium Leipzig
2001 - 2002	Zivildienst Universitätsklinikum Leipzig
2002 - 2003	Studium der Drucktechnik an der HTWK Leipzig
2003 - 2008	Studium der Pharma-Biotechnologie an der Fachhochschule Jena
Dez. 2008	Diplom-Ingenieur(FH) für Pharma-Biotechnologie
Seit Dez. 2010	Promotionskolleg an der TU Darmstadt, Fachbereich Chemie, Allgemeine Biochemie, Prof. Harald Kolmar
Berufliche Tätigkeiten	
Juni – August 2003	zwölfwöchiges Praktikum im Umweltforschungszentrum Leipzig
01.03.2007 – 29.02.2008	Praxissemester SCHOTT JENAer GLAS GmbH/Schott Nexterion
01.07.2008 – 27.12.2008	Diplomarbeit SCHOTT JENAer GLAS GmbH/Schott Nexterion
01.01.2009 – 31.12.2012	Angestellter der Invigate GmbH Jena
Seit 01.01.2013	Angestellter der Eurobiosciences GmbH in Jena

Matthias Schirmer

---

## 6.9 Selbständigkeitserklärung

---

Matthias Schirmer  
Camsdorfer Ufer 2  
07749 Jena

Datum  
20. September 2016

### Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig und nur mit den angegebenen Hilfsmitteln angefertigt habe.

Matthias Schirmer

---

## 6.10 Promotionserklärung

---

Matthias Schirmer  
Camsdorfer Ufer 2  
07749 Jena

Datum  
20. September 2016

## Erklärung

Ich erkläre hiermit, noch keinen Promotionsversuch unternommen zu haben.

Matthias Schirmer

---

## 6.11 L<sup>A</sup>T<sub>E</sub>X

---

Dieses Arbeit wurde unter Verwendung der folgenden L<sup>A</sup>T<sub>E</sub>X-Vorlage erstellt:

URN: urn:nbn:de:tuda-tuprints-12345

URL: <http://tuprints.ulb.tu-darmstadt.de/1234>